

Postovulatorische Eialterung in *Xenopus tropicalis*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät
für Biologie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dipl. Biologin

Anna Kosubek

aus Mikołów in Oberschlesien

Februar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) sowie am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

2. Gutachter: Prof. `in Dr. Ruth Grümmer

3. Gutachter: Prof. Dr. Gerhart Ryffel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hynek Burda

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2013

Teile der Arbeit sind wissenschaftlich publiziert:

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Rademacher,K., Horsthemke,B., Ryffel,G.U. (2010)

Aging of *Xenopus tropicalis* eggs leads to deadenylation of a specific set of maternal mRNAs and loss of developmental potential. PLoS One 5(10): e13532.

meiner Mutter
Grazyna Kosubek, geb. Leks
gewidmet

... Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne

Wie jede Blüte welkt und jede Jugend
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	15
1.1 Das Eizellenpotenzial	15
1.2 Die postovulatorische Eialterung und ihre Folgen	18
1.3 Veränderte Prozesse im alternden Ei.....	20
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	22
 2 MATERIAL UND METHODEN	 24
2.1 Postovulatorische Eialterung	24
2.1.1 Gewinnung von Eizellen und Embryonen.....	24
2.1.2 Bestimmung des Eizellenpotenzials	26
2.2 DNA Methylierungsanalyse	26
2.2.1 DNA Isolierung.....	26
2.2.1.1 Phenol/Chloroform Extraktion genomischer DNA	27
2.2.1.2 DNA Isolierung mittels DNA Kit.....	28
2.2.2 Bisulfitbehandlung genomischer DNA	28
2.2.3 PCR bisulfitbehandelter DNA	29
2.2.4 Sequenzierung	30
2.3 Analyse maternalen mRNA.....	30
2.3.1 RNA Isolierung.....	30
2.3.1.1 RNA Isolierung mittels Trizolreagenz.....	30
2.3.1.2 RNA Isolierung mittels PeqGOLD Total RNA Isolierung Kit	31
2.3.2 Microarray Analyse	31
2.3.3 Gen-Ontologie Analyse	32
2.3.4 Relative quantitative reverse Transkription Echtzeit PCR (qRT-PCR)	33
2.3.5 Bestimmung der PolyA-Längen mit dem RNA-Ligation-PolyA-Test (RL-PAT).....	36
2.3.6 Präparation vom Eiextrakt.....	37
2.3.7 <i>In silico</i> Analyse der 3'NTR.....	38
2.3.7.1 Bestimmung der 3'NTR-Länge	38
2.3.7.2 Analyse der 3'NTR auf das Vorkommen cis-regulatorischer Elemente.....	38
2.3.7.3 Zuordnung im Array bestimmter SONDENSÄTZE zu Transkriptkategorien	40

3 ERGEBNISSE	41
3.1 Etablierung von <i>Xenopus tropicalis</i> als Modellorganismus	41
3.2 Einfluss der Eialterung auf die DNA Methylierung einzelner Gene	44
3.2.1 Optimierung der DNA Isolierung aus frühen Embryonen	44
3.2.2 Methylierungsmuster von <i>Xbra</i> , <i>cardiac Actin</i> und <i>c-Myc</i>	46
3.3 Analyse maternaler mRNA	49
3.3.1 Optimierung von RNA Isolierung und Qualitätsanalyse	49
3.3.2 Microarray Analyse polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern	53
3.3.3 Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA korreliert mit Potenzialverlust in verschiedenen Weibchen.....	56
3.3.4 Korrelation zwischen Potenzialverlust und reduzierter Menge polyadenylierter Transkripte besteht unter verschiedenen Alterungsbedingungen	57
3.3.5 Transkripte werden deadenyliert statt degradiert.....	59
3.3.6 Transkriptverhalten in alternden Eiextrakten	62
3.3.7 <i>In silico</i> Analyse der 3' nicht translatierten Regionen	65
3.3.7.1 Signalverminderte Transkripte besitzen eine kurze 3'NTR-Länge	65
3.3.7.2 Während der Alterung signalreduzierte Transkripte sind an CPE und PAS unterrepräsentiert	66
3.3.7.3 Während der Eialterung signalverminderte Transkripte sind in während der Eireifung sowie nach der Befruchtung deadenylierten Transkripten angereichert.....	69
4 DISKUSSION	71
4.1 <i>Xenopus tropicalis</i> als Modellorganismus	71
4.2 Potenzialverlust verzögert befruchteter Froscheier	75
4.3 DNA Methylierung spezifischer Gene in Embryonen aus gealterten Eizellen	77
4.4 Postovulatorische Alterung führt zur Deadenylierung zahlreicher Transkripte	79
4.5 Die während der Eialterung signalverminderten mRNA sind hauptsächlich durch Haushaltsgene kodiert	83
4.6 Ein ovuliertes Ei reift weiter	86
4.7 Gealterte Eizellen zeigen Prozesse, die sonst erst nach der Befruchtung erfolgen	90
4.8 Postovulatorische Alterung beim Menschen	93
5 ZUSAMMENFASSUNG	99

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	100
7 ANHANG.....	114
8 DANKSAGUNG	125
9 PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE, POSTER.....	126
10 LEBENSLAUF	127
11 ERKLÄRUNG.....	128

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersichtschema zum Versuchsaufbau der postovulatorischen Eialterung, Bestimmung des Eipotenziales und Gewinnung von Proben für weitere molekulare Analysen.....	25
Abb. 2: Einfluss postovulatorischer Alterung auf die Eiqualität.	43
Abb. 3: Qualitätsunterschiede in der Präparation genomischer DNA.	45
Abb. 4: Schematische Darstellung der Gene <i>c-Myc</i> , <i>Xbra</i> und <i>cardiac Actin</i> in <i>X. tropicalis</i>	46
Abb. 5: DNA Methylierung von <i>Xbra</i> , <i>c-Myc</i> und <i>cardiac Actin</i> in Embryonen aus frischen und gealterten Eiern.	48
Abb. 6: RNA Ausbeute beeinflussende Faktoren.	51
Abb. 7: Vergleich der Qualität totaler RNA aus frischen sowie gealterten bzw. befruchtbaren und nicht befruchtbaren Eizellen.	52
Abb. 8: Vergleich der cRNA Qualität aus frischen sowie gealterten Eizellen.	53
Abb. 9: Veränderungen des Transkriptomes in Eiern mit während der Alterung gemindertem Entwicklungspotenzial.	54
Abb. 10: Quantifizierung spezifischer polyadenylierter Transkripte während der Eialterung.	56
Abb. 11: Korrelation zwischen vermindertem Eipotenzial und reduzierter Menge polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern bei verschiedenen Weibchen.	57
Abb. 12: Minderung der Transkriptsignale in in MBS bzw. feuchter Kammer gealterten Eiern im Vergleich.	58
Abb. 13: Vergleich von <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> gealterten Eiern.	59
Abb. 14: Vergleich von Oligo(dT) ₂₀ und <i>random</i> Hexanukleotid vermittelter qRT-PCR.	60
Abb. 15: PolyA-Längenänderung in spezifischen Transkripten während der Eialterung.	61
Abb. 16: Reduzierung der Menge polyadenylierter Transkripte während Eialterung, Extrakterstellung und Extraktalterung im Vergleich.	63
Abb. 17: PolyA-Längenbestimmung in frischen sowie gealterten Eiern bzw. Extrakten im Vergleich.	64
Abb. 18: Reduzierung der Menge polyadenylierter Transkripte in enthüllten sowie nicht enthüllten gealterten Eiern im Vergleich.	64

Abb. 19: Reduzierung der Transkriptsignale korreliert mit einer kurzen 3'NTR-Länge.	66
Abb. 20: Häufigkeit der Polyadenylierung regulierenden Elemente MBE, TCS, CPE und PAS in während der Eialterung veränderten Transkripten.....	68
Abb. 21: Häufigkeit des deadenylierenden Elementes ARE in während der Eialterung veränderten Transkripten.....	69
Abb. 22: Verteilung maternaler während der Eialterung signalverminderter mRNA gemäß bekannten Adenylierungsverhalten während Eireifung sowie nach Befruchtung.	70
Abb. 23: Vereinfachtes Modell zum Potenzialverlust pre- sowie postovulatorisch gealterter Oozyten.	98

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zur Methylierungsanalyse verwendete PCR-Primer.....	29
Tab. 2: In qRT-PCR analysierte Transkripte.....	34
Tab. 3: Für RL-PAT verwendete Primer.	37
Tab. 4: In der 3'NTR gesuchte regulatorische Elemente.....	39
Tab. 5: Optimierung der RNA Isolierung zur Analyse der Menge polyadenylierter Transkripte.....	50
Tab. 6: Microarray Analyse polyadenylierter mRNA.	55
Tab. 7: Vorteile der Verwendung von <i>Xenopus</i> zum Studium der postovulatorischen Eialterung im Vergleich zur Maus als Modellorganismus.	74
Tab. A1: Während der Eialterung am stärksten signalreduzierte SONDENSÄTZE.....	114
Tab. A2: Gen-Ontologie Analyse der in gealterten Eiern ≥ 2 fach signalverminderten SONDENSÄTZE.....	118
Tab. A3: Zuordnung signalreduzierter SONDENSÄTZE in 7 Kategorien anhand des Adenylierungsverhaltens der zugehörigen Transkripte.....	121

Abkürzungen

A	<u>A</u> denine
Abb.	<u>A</u> bbildung
ARE	AU reiches Element (<u>A</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>rich</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u>)
ART	assistierte Reproduktionstechnologie (<u>a</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>v</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>y</u>)
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BP	bindendes Protein (<u>b</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u>)
BSA	Rinderserumalbumin (<u>B</u> <u>o</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>u</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>b</u> <u>u</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u>)
C	<u>C</u> ytosin
Ct	<u>t</u> <u>h</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>d</u> <u>c</u> <u>y</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>e</u>
cDNA	komplementäre DNA (<u>c</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>p</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>y</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>A</u>)
CPE	cytoplasmatischen Polyadenylierungselement (<u>c</u> <u>y</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>l</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>y</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u>)
CPEB	CPE bindendes Protein (<u>C</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>b</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u>)
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
CPSF	<u>c</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>v</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>y</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>f</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>y</u> <u>f</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>r</u>
cRNA	komplementäre RNA (<u>c</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>p</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>y</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u>)
D	<u>D</u> eadenylierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> <u>e</u> <u>o</u> <u>x</u> <u>y</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>d</u>)
DNase	<u>D</u> <u>e</u> <u>o</u> <u>x</u> <u>y</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>u</u> <u>k</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u>
DMR	differentiell methylierte Region (<u>d</u> <u>i</u> <u>f</u> <u>f</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>h</u> <u>y</u> <u>l</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>g</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>)
EDEN	embryonales Deadenylierungselement (<u>e</u> <u>m</u> <u>b</u> <u>r</u> <u>y</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>y</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u>)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (<u>e</u> <u>t</u> <u>h</u> <u>y</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>t</u>)
ePAB	<u>e</u> <u>m</u> <u>b</u> <u>r</u> <u>y</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>(A)</u> - <u>b</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u>
ESHRE	<u>E</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>S</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>y</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>H</u> <u>u</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>R</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>E</u> <u>m</u> <u>b</u> <u>r</u> <u>y</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>y</u>
EST	<u>e</u> <u>x</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>g</u> <u>s</u>
et al.	und weitere (<u>e</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>i</u>)
Exp.	<u>E</u> <u>x</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u>
F	<u>f</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>w</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>d</u> (-Primer)
F2	2. Tochtergeneration (<u>f</u> <u>i</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>)
FSH	<u>f</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>k</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>u</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>H</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>o</u> <u>n</u>
G	<u>G</u> uanin
GEO	<u>G</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>E</u> <u>x</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>O</u> <u>m</u> <u>n</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>u</u> <u>s</u>
GO	Gen Ontologie (<u>G</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>O</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>y</u>)
GO EAST	<u>G</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>O</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>y</u> <u>E</u> <u>n</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>A</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>S</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>t</u> <u>w</u> <u>a</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>T</u> <u>o</u> <u>o</u> <u>k</u> <u>i</u> <u>t</u>
GS	<u>G</u> <u>e</u> <u>n</u> - <u>s</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>f</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>c</u> <u>h</u>
GVBD	Auflösen der Kernhülle (<u>G</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>V</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>B</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>k</u> <u>d</u> <u>o</u> <u>w</u> <u>n</u>)
hCG	<u>h</u> <u>u</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>e</u> s <u>C</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>i</u> <u>n</u>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
ID	<u>I</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>f</u> <u>i</u> <u>k</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>
ICSI	intracytoplasmatische Spermieninjektion (<u>i</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>y</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>l</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>j</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>)
IVF	in-vitro-Befruchtung (<u>i</u> <u>n</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>l</u> <u>i</u> <u>z</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>)
IVT	in vitro Transkription (<u>i</u> <u>n</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>s</u> <u>c</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>p</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>)
K	<u>K</u> ontrolle
LH	<u>L</u> <u>u</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>e</u> s <u>H</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>o</u> <u>n</u>
-Lig	Negativkontrolle der Ligation (Lig)
LR	<u>l</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>s</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u>

LS	<u>L</u> ängen <u>s</u> tandard (Größenmarker)
MII	2. <u>M</u> etaphase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen (<u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
MBE	Musashi bindendes Element (<u>M</u> usashi <u>b</u> inding <u>e</u> lement)
MBS	<u>M</u> odified <u>B</u> arth <u>S</u> olution
MBT	<u>M</u> id <u>B</u> lastula <u>T</u> ransition
MPF	reifungsfördernder Faktor (<u>m</u> aturation <u>p</u> romoting <u>f</u> actor)
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<u>m</u> essenger <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
N	Anzahl
NaOH	Natronlauge
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation, USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)
nk PAS	nicht <u>k</u> anonisches Polyadenylierungssignal
NTR	nicht <u>t</u> ranslatierte <u>R</u> egion
p	Signifikanzwert (<u>p</u> robability)
P	<u>P</u> olyadenylierung
PARN	Poly(A) RNase (<u>p</u> oly(<u>A</u>)- <u>s</u> pecific <u>r</u> ibon <u>u</u> clease)
PAS	Polyadenylierungssignal (<u>p</u> oly <u>a</u> denylation <u>s</u> ignal)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>P</u> CR)
R	<u>r</u> evers (-Primer)
RL	<u>R</u> NA <u>l</u> ater (Reagenz)
RL-PAT	<u>R</u> NA- <u>L</u> igation- <u>P</u> oly <u>A</u> - <u>T</u> est
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RNase	<u>R</u> ibon <u>u</u> klease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
rRNA	ribosomale RNA (<u>r</u> ibosomal <u>R</u> NA)
RSB	Retikulozyt Standard Puffer (<u>r</u> eticulocyte <u>s</u> tandard <u>b</u> uffer)
-RT	Minus RT; Negativkontrolle der RT
RT	reverse Transkription (<u>r</u> everse <u>t</u> ranscription)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SSC	<u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate (-Puffer)
StAbw.	<u>S</u> tandard <u>a</u> bweichung
T	<u>T</u> hymine
Tab.	<u>T</u> abelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA (-Puffer)
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orate- <u>E</u> DTA (-Puffer)
TCS	Translation kontrollierende Sequenz (<u>t</u> ranslation <u>c</u> ontrol <u>s</u> equences)
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA (-Puffer)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UCSC	<u>U</u> niversity of <u>C</u> alifornia <u>S</u> anta <u>C</u> ruz, USA (http://genome.ucsc.edu)
X.	<u>X</u> enopus

Allgemein übliche Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt. Abkürzungen für chemische Verbindungen entsprechen den IUPAC-Regeln.

Einheiten

bp	<u>B</u> asenpaare
°C	Grad <u>C</u> elsius
dpc	Tag(e) nach Coitus (<u>d</u> ay(s) <u>p</u> ost <u>c</u> oitum)
dpf	Tag(e) nach Befruchtung (<u>d</u> ay(s) <u>p</u> ost <u>f</u> ertilization)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) (<u>a</u> cceleration of <u>g</u> ravity)
g	<u>G</u> ramm
G	<u>G</u> iga (10 ⁹)
Gbp	<u>G</u> igab <u>a</u> senpaare
h	Stunde(n) (<u>h</u> our(s))
hpi	Stunde(n) nach Besamung (<u>h</u> our(s) <u>p</u> ost <u>i</u> nsemination)
kb	<u>K</u> ilobasenpaar
l	<u>L</u> iter
M	<u>M</u> olar (mol/l)
μ	<u>M</u> ikro (10 ⁻⁶)
μg	<u>M</u> ikrogramm
μl	<u>M</u> ikroliter
μM	<u>M</u> ikromolar
m	<u>M</u> illi (10 ⁻³)
min	<u>M</u> inute(n)
ml	<u>M</u> illiliter
mM	<u>M</u> illimolar
n	<u>N</u> ano (10 ⁻⁹)
ng	<u>N</u> anogramm
nm	<u>N</u> anometer
nt	<u>N</u> ukleotide
p	<u>P</u> ico (10 ⁻¹²)
pg	<u>P</u> icogramm
pH	<u>P</u> otentia <u>h</u> ydrogenii, -log[H ⁺]
pmol	<u>P</u> icomol
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
s	<u>S</u> ekunde(n)
U	Einheit (<u>U</u> nit)
Vol.	<u>V</u> olumen

1 Einleitung

1.1 Das Eizellenpotenzial

Die Eizelle ist der unbewegliche weibliche Gamet. Nach Befruchtung durch ein Spermium bildet sie die totipotente Zygote, aus der sich ein neuer Organismus entwickelt. Das Spermium steuert dabei im Wesentlichen die väterliche DNA und Centriole bei (Schatten *et al.*, 1986). Demzufolge muss die Oozyte alle nötigen Komponenten enthalten, die benötigt werden für die Vollendung der Meiose, die Reprogrammierung der Genome, Herstellung der Totipotenzen, Beginn der Zellteilung, sowie für Metabolismus und Differenzierung des frühen Embryos (Mtango *et al.*, 2008). Diese Fähigkeit der Oozyte befruchtet zu werden sowie sich zu einem normalen Embryo zu entwickeln nennt man das Eizellenpotenzial. Es beeinflusst sowohl die Qualität des frühen Embryos als auch das adulte Leben sowie bei Säugern zusätzlich Beginn und Verlauf der Schwangerschaft (Krisher, 2004). Es wird während der Oogenese erworben (Ottolenghi *et al.*, 2004).

Unter Oogenese versteht man die Entwicklung einer Eizelle. Sie besteht aus den drei Phasen Proliferation, Wachstum und Reifung. Während der Proliferationsphase differenzieren sich Urgeschlechtszellen zu Oogonien. Diese teilen sich mitotisch bis sie die 1. meiotische Teilung beginnen und zu primären Oozyten werden. Während des Pachytäns kommt es zur starken Replikation ribosomaler Gene, einer hohen Transkriptionsrate der RNA-Polymerase I und der Bildung zahlreicher Ribosomen. Diese werden für die hohe Proteinbiosyntheserate während der Wachstumsphase benötigt. Die gesamte Wachstumsphase liegt in der Prophase der 1. meiotischen Teilung. Im Diplotän der 1. Prophase wird die Oozyte arretiert, in der sie Wochen (bei der Maus), Monate bis Jahre (beim Frosch) bis zu Dekaden (beim Mensch) verbleibt (Brook *et al.*, 2009).

Die Wiederaufnahme der Meiose wird beim Frosch durch die Paarung induziert. Die Umklammerung des Weibchens durch das Männchen führt zum Anstieg des luteinisierenden (LH) sowie des follikelstimulierenden Hormons (FSH), die die Synthese und Sekretion des natürlichen effektorischen Steroidhormons Progesteron

innerhalb der Follikelzellen veranlassen. Das Progesteron wird über Membranrezeptoren von der Oozyte erkannt und bewirkt das Auflösen der Kernhülle (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD) und den Abschluss der 1. Reduktionsteilung, was über das Abschnüren des 1. Polkörperchens erkennbar ist. Die sekundäre Oozyte durchläuft die 2. Prophase und arretiert in der 2. Metaphase. Diese Aufhebung der Prophase 1 Arretierung und das Fortschreiten der meiotischen Teilung wird als Eireifung bezeichnet. Diese MII Oozyte, in dieser Arbeit „Eizelle“ genannt, wird ovuliert, im Ovidukt mit einer Gallerthülle umgeben und ins Wasser gelaicht. Da das Männchen beständig auf dem Weibchen sitzt, wird der Laich sofort besamt.

Sobald das Spermium an die Gallertschicht gebunden hat, tritt die Akrosomreaktion ein. Dadurch schraubt sich das Spermium durch die Eihülle und fusioniert mit dem Oolemma. Dabei wird das Ei aktiviert. Es folgt eine Depolarisation des Oolemma sowie die Ausschüttung von freiem Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), was die Exozytose kortikaler Granula in den Perivitellin-Raum zur Folge hat. Hierdurch wird das Eindringen weiterer Spermien verhindert. Das Ei schließt die 2. meiotische Teilung ab, was durch die Abschnürung des 2. Polkörperchens ersichtlich wird. Die Chromosomen werden dekontensiert und bilden den weiblichen bzw. männlichen Pronukleus. Diese haploiden Pronuklei verdoppeln ihre DNA und wandern zur Zellmitte, wo die Pronukleimembran aufgelöst wird und die kondensierten Chromosomen sich innerhalb einer mitotischen Spindel anordnen. Die entstandene diploide Zygote teilt sich anschließend. Beim *Xenopus* erfolgt die erste Teilung ca. 90 min nach Besamung. Die nächsten 11 Teilungen finden in interphasefreien Abständen von 20 - 30 min statt (Heasman, 2006), so dass bereits 6 h nach Besamung (hours post insemination, hpi) das Blastula- bzw. 9 hpi das Gastrulastadium erreicht sind. Nach nur 4 Tagen ist die Organogenese abgeschlossen und die freischwimmende Larve kann eigenständig Nahrung aufnehmen.

In Vertebraten erfolgen die ersten Prozesse nach der Eibefruchtung hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, unter der Kontrolle maternaler Eikomponenten, da die reife Oozyte bzw. der frühe Embryo transkriptionsinaktiv sind. Bei der Maus findet die Aktivierung des embryonalen Genoms im 2-Zell Stadium statt (Levey *et al.*, 1978; Young *et al.*, 1978; Tadros und Lipshitz, 2009), beim Frosch erst gegen Ende des 12. Zellzyklus während der Mid Blastula Transition (MBT) (Haesman, 2006; Brook *et*

al., 2009). Die Transkriptionsrepression mag u.a. durch DNA Methylierung reguliert sein. Darunter versteht man eine epigenetische Modifikation der DNA, bei der in einer Cytosin-Guanin Dinukleotidfolge (CpG) an das 5' Kohlenstoffatom des Cytosin-Restes eine Methylgruppe angehängt wird (Bird, 2002). Meist führt die DNA Methylierung, speziell in Promotorbereichen, zur Transkriptionsrepression der entsprechenden Gene. U.a. rekrutieren dabei Methylcytosin bindende Proteine Histondeacetylasen, die zu einer Chromatinverdichtung führen, wodurch die DNA für Transkriptionsfaktoren sowie die RNA Polymerase schwerer zugänglich wird. Dass die DNA Methylierung in den pre-MBT Stadien von *Xenopus* die Transkription unterdrücken mag, zeigt ein Versuch, bei dem die Inaktivierung der *Maintenance* DNA Methyltransferase xDnmt1 zu einer vorzeitigen Demethylierung und Expression zygotischer Gene führte (Stancheva und Meehan, 2000). Inwieweit die Repression der Transkription in der Oozyte bzw. in der Zygote durch die DNA Methylierung reguliert wird, ist jedoch weitgehend unbekannt.

Das Ei enthält große Protein- und RNA-Vorräte, die während der Wachstumsphase angesammelt werden. Man schätzt, dass eine ausgewachsene meiosekompetente Mausoozyte ca. die 200 fache RNA Menge im Vergleich zu einer somatischen Zelle besitzt (nach Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002). Diese wird benötigt, um die frühe Embryogenese zu gewährleisten. Denn mit der Aufhebung der Meiosearretierung und dem GVBD kommt die RNA Synthese zum Erliegen, die Proteinsynthese hält aber an (Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002; Gosden und Lee, 2010). Das heißt, in der reifen Oozyte, in der Zygote sowie dem frühen Embryo wird die Proteinbiosynthese ausschließlich durch maternale Transkripte posttranskriptionell gesteuert. Dabei werden manche maternalen Transkripte auch nach der embryonalen Genaktivierung weiterhin benötigt (Renard *et al.*, 1994).

Die Translation wird hauptsächlich über die Bildung des Translationsinitiationskomplexes gesteuert, indem Proteine an das 5' und 3' Ende der mRNA binden und miteinander interagierend die ribosomalen Untereinheiten rekrutieren. Dies führt zur Zirkulation der mRNA, was nicht nur für den Beginn der Translation essentiell ist, sondern auch die mRNA vor Degradierung schützt (Mtango *et al.*, 2008; Brook *et al.*, 2009). Die Translationseffizienz wird über die PolyA-Länge bestimmt. Polyadenylierte mRNA werden translatiert, während mRNA mit kurzen PolyA translationsinaktiv verbleiben. Im Gegensatz zu vielen somatischen Zellen werden in Oozyten deadenylierte Transkripte nicht degradiert, sondern können erneut polyadenyliert und

somit translationsaktiviert werden (Huarte *et al.*, 1992; Brook *et al.*, 2009). Der richtige Zeitpunkt der Translation wird über spezifische cis-Elemente in der 3' nicht translatierten Region (NTR) der jeweiligen Transkripte reguliert. An diese binden regulatorische Proteine, welche je nach Entwicklungsstadium cytoplasmatische Polymerasen bzw. Deadenylasen rekrutieren. Die Eireifung sowie die Befruchtung sind dabei zwei Schlüsselereignisse, die den Adenylierungszustand vieler Transkripte verändern. So werden während der Eireifung als Antwort auf die Progesteronausschüttung zahlreiche spezifische Transkripte sequenziell aktiviert. Die Polyadenylierung von Transkripten vor dem GVBD wird dabei als frühe Polyadenylierung bezeichnet und von dem Musashi bindenden Element (*Musashi binding element*, MBE) und der Translation kontrollierenden Sequenz (*translation control sequence*, TCS) reguliert. Die späte Polyadenylierung, die nach dem GVBD erfolgt, wird dagegen von dem cytoplasmatischen Polyadenylierungselement (*cytoplasmic polyadenylation element*, CPE) gesteuert (Radford *et al.*, 2008; Kronja *et al.*, 2010; Macnicol und Macnicol, 2010). Die Deadenylierung von Transkripten während der Eireifung bzw. im frühen Embryo kann gezielt über deadenylierende Elemente wie das AU reiche Element (*AU rich element*, ARE) oder das embryonale Deadenylierungselement (*embryo deadenylation element*, EDEN) induziert sein (Audic *et al.*, 1998; Voeltz und Steitz, 1998; Macnicol und Macnicol, 2010) bzw. bei Transkripten, denen regulatorische cis-Elemente fehlen, standardmäßig erfolgen (Fox und Wickens, 1990; Varnum und Wormington, 1990). Die sequentielle Adenylierung bzw. Deadenylierung von Transkripten muss dabei zeitlich genauestens reguliert sein, um einen korrekten Ablauf des Zellzyklus zu gewährleisten. Dies ist eine Voraussetzung für die Befruchtbarkeit der Oozyte sowie für eine normale zygotische Entwicklung.

1.2 Die postovulatorische Eialterung und ihre Folgen

Wenn man bedenkt, dass der weibliche Gamet seine Entwicklung bereits im Fetus beginnt und erst im Erwachsenenalter vollendet, ist es erstaunlich, dass einer ovulierten Oozyte lediglich ein paar Stunden für die Befruchtung verbleiben. In dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* bleibt das ovulierte Ei maximal 12 h befruchtbar (Sive *et al.*, 2000). Bei Säugern sind dies je nach Art zwischen 12 - 24 h (Blandau, 1954; Mailhes *et al.*, 1998; Fissore *et al.*, 2002; Gordo *et al.*, 2002), optimaler Weise sogar

nur zwischen 4 - 6 h (Lacham-Kaplan und Trounson, 2008). Bleibt die Besamung aus, schwindet die Fähigkeit der Eizelle befruchtet zu werden sowie ein gesundes Embryo zu entwickeln. Diesen Potenzialverlust nennt man postovulatorische Eialterung. Es ist nicht, wie oft angenommen, dass sobald ein Befruchtungszeitfenster überschritten wird, die Eizelle zeitnah abstirbt. Vielmehr findet man eine problematische Übergangszone, in der die Eizelle zwar noch sehr gut befruchtungsfähig bleibt, die Embryonalentwicklung jedoch bereits stark beeinträchtigt ist und fehlerhaft verläuft.

Die postovulatorische Eialterung ist das Ergebnis einer verzögerten Befruchtung und sollte nicht verwechselt werden mit der verzögerten Ovulation (preovulatorische Alterung) oder dem Alter der Mutter. Folglich wird in dieser Arbeit, wenn nicht anders angegeben, unter einer gealterten Eizelle stets die postovulatorische Alterung angesprochen. Streng genommen ist die postovulatorische Alterung die Folge einer verstrichenen Zeit, in der eine ovulierte Eizelle nicht besamt wurde. Der Lesbarkeit halber verwende ich den Term alternd bzw. gealtert in Form von postovulatorisch nicht zeitnah besamt, unabhängig vom kausalen Zusammenhang zwischen Alterung und Potenzialverlust.

Bereits 1882 erkannte Pflüger, dass eine verspätete Befruchtung von Froscheiern (*Rana temporaria*) zu einem Verlust des Eipotenzials führt. Er verglich dabei frische Eier („im Zustande der höchsten Entwicklung“) mit verspätet befruchteten Eiern („in dem der Ueberreife“) von ein und demselben Weibchen. Bei letzteren beobachtete er, dass diese nachträglich während der Embryonalentwicklung abstarben oder verkümmerte Organe aufwiesen (Pflüger, 1882). Weitere Studien in Karpfen (Boulekbache *et al.*, 1988), Forelle (Aegeter *et al.*, 2004 und 2005), dem Frosch *Rana* (Witschi, 1952; Witschi und Laugens, 1963), Mehrschweinchen (Blandau und Young, 1939), Ratte (Blandau und Jordan, 1941), Maus (Gullett *et al.*, 1998; Tarín *et al.*, 1999; Lacham-Kaplan und Trounson, 2008), Hamster (Juetten und Bavister, 1983) und Kuh (Pursley *et al.*, 1998) bestätigten, dass die Befruchtung gealterter Eier zu einem drastischen Anstieg einer anormalen Embryonalentwicklung führt.

Die Befruchtung einer gealterten Eizelle erhöht nicht nur die Mortalität sowie Anomalie des frühen Embryos sondern kann zu Beeinträchtigungen während der gesamten Lebenszeit führen. So zeigten Mäuse aus postovulatorisch gealterten Eizellen im Jungtierstadium Kleinwüchsigkeit und einen verzögerten Reflex sich

aufzurichten (*righting reflex*) sowie im Erwachsenenalter eine erhöhte spontane motorische Aktivität sowie Emotionalität (Tarín *et al.*, 1999). Auch besaßen diese eine reduzierte Lebenserwartung und eine reduzierte reproduktive Fitness. Die Männchen waren auffällig infertil. Die weiblichen Tiere brachten ebenfalls viel weniger Nachkommen zur Welt; die Würfe waren kleiner, die schwangerschaftsfreien Abstände länger. Die Langzeitfolgen der verzögerten Befruchtung setzten sich sogar in der F2 Generation fort. So zeigten die Nachkommen der aus gealterten Eiern hervorgegangenen Mäuse Missbildungen, eine erhöhte Jungtiersterblichkeit und ein reduziertes Absetzgewicht (Tarín *et al.*, 2002).

1.3 Veränderte Prozesse im alternden Ei

In den letzten 50 Jahren sind zahlreiche Veränderungen in Morphologie, Zellbiologie und Biochemie einer gealterten Zelle berichtet worden. So fand man in Säugern unter anderem strukturelle Änderungen der Plasmamembran (Longo, 1974 und 1981; Szollosi, 1975), Verlust bzw. Bruch der Aktin Mikrofilamente im Oozytencortex (Kim *et al.*, 1996), strukturelle Veränderungen sowie Verhärtung der Zona pellucida (Longo, 1981; Xu *et al.*, 1997; Diaz und Esponda, 2004 a), einen vergrößerten Perivitellin-Raum sowie Migration und partielle Exozytose von kortikalen Granula (Ducibella *et al.*, 1990; Diaz und Esponda, 2004 b). Weiterhin wurden bei diversen Säugern zahlreiche Veränderungen des Spindelapparates berichtet (Longo, 1974; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1996) sowie vorzeitige Chromosomentrennung (Angell, 1991; Dailey *et al.*, 1996; Mailhes *et al.*, 1998), fehlerhafte Verteilung der Chromosomen von der Metaphasenplatte (Ducibella *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1993; Mailhes *et al.*, 1998) sowie Dekondensation dieser (Szollosi, 1975; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1988; Van Wissen *et al.*, 1991). Das 1. Polkörperchen degenerierte bzw. war in gealterten Eizellen nicht mehr am Spindelapparat anliegend (Fissore *et al.*, 2002). Ebenfalls wurden Polyploidie und Aneuploidie (Shaver und Carr, 1967; Vickers, 1969; Yamamoto und Ingalls, 1972; Juetten und Bavister, 1983; Plachot *et al.*, 1988; Sakurada *et al.*, 1996; Mailhes *et al.*, 1998) in Zygoten aus gealterten Eizellen beobachtet.

Biochemische Veränderungen betrafen Störungen im Calcium- und ATP-Haushalt (Igarashi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011) sowie abnorme Kinase und Phosphataseaktivitäten. In gealterten Schweinoozyten fand man

niedrigere Mengen des aktiven reifungsfördernden Faktors (*maturation promoting factor*, MPF) und mitogenaktivierter Proteinkinasen (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) (Kikuchi *et al.*, 1995 und 2000; Ma *et al.*, 2005; Petrova *et al.*, 2009), in gealterten Rinderoozyten weniger des aktiven MPF (Liu *et al.*, 1998) und in Mausoozyten weniger MAPK (Xu *et al.*, 1997).

Es wurden epigenetische Änderungen der DNA in postovulatorisch gealterten Eizellen beschrieben. Zum Beispiel wurde die DNA der Gene *Pegl/Mest* (Imamura *et al.*, 2005) und *Snrpn* (Liang *et al.*, 2008) während der Alterung von Mausoozyten demethyliert. Die Eialterung beeinflusst jedoch nicht nur die Methylierung genomisch geprägter Gene in Oozyten, sondern auch in späteren Embryonalstadien. So fand man in Plazentas von 10,5 dpc Mausembryonen, die aus gealterten Eiern stammen, die differentiell methylierte Region (*differential methylated region*, DMR) von H19 hypomethyliert vor (Liang *et al.*, 2011). Eine sukzessive Erhöhung des Acetylierungsgrades von Lysin 14 in Histon H3 und Lysin 8 und 12 in Histon H4 wurde *in vitro* sowie *in vivo* während der Alterung von Mausoozyten berichtet. Zudem konnte der Eialterungsprozess durch Erhöhung der Acetylierung der beiden Histone durch die Zugabe von Trichostatin A, einem Histondeacetylase-Inhibitor, beschleunigt werden (Huang *et al.*, 2007).

Ein Zusammenhang zwischen den hier beschriebenen Veränderungen, ob es sich um Veränderungskaskaden oder einzelne, unabhängige Prozesse handelt ist bisher kaum bekannt (Miao *et al.*, 2009). Auch weiß man nicht, inwieweit es sich hier um Folgen oder um primäre Ursachen der schwindenden Qualität einer gealterten Eizelle handelt. Obwohl seit den 50er-Jahren des 20. Jh. zahlreiche molekulare, biochemische und zelluläre Veränderungen während der postovulatorischen Eialterung intensiv studiert wurden, sind Veränderungen des Transkriptom in gealterten Eiern bisher kaum beschrieben worden. Es gibt wenige Studien, in denen mittels qRT-PCR einzelne mRNA in gealterten Eiern verändert gemessen wurden. Zum Beispiel fand man in Rinderoozyten reduzierte Mengen der für Mos kodierenden (Wu *et al.*, 1997), sowie in Schweine- (Ma *et al.*, 2005) bzw. Mausoozyten (Gordo *et al.*, 2002; Steuerwald *et al.*, 2005) reduzierte Mengen der für Mad2 bzw. BCL2 kodierenden mRNA. In der Regenbogenforelle korrelierte die Anzahl bestimmter Transkripte nicht nur mit dem Alter des Eies, sondern auch mit dem hierdurch reduzierten Eipotenzial (Aegerter *et al.*, 2004 und 2005). Eier, die sich durch ein niedriges Potential auszeichneten, besaßen weniger für Npm2, Tubulin β , JNK1 und

Cyclin A1 bzw. mehr für Keratin 8 und 18, Cathepsin Z und Prostaglandin Synthase 2 kodierender mRNA (Aegerter *et al.*, 2005). Diese Studien, Änderungen im Proteom gealterter Schweineoozyten (Jiang *et al.*, 2011) sowie Beobachtungen, dass Eier schlechterer Qualität Veränderungen der maternalen Transkripte zeigen (Hamatani *et al.*, 2004; Bonnett *et al.*, 2007; Grondahl *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010 a) weisen darauf hin, dass die postovulatorische Alterung die Vorräte maternaler mRNA beeinflussen mag.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die molekularen Vorgänge einer postovulatorisch alternden Eizelle zu ergründen. Anders formuliert: Was passiert in einem befruchtungsfähigem Ei, wenn das Spermium auf sich warten lässt?

Es wurde ein Modellorganismus erwünscht, der erstens große Mengen frisch ovulierter Eizellen bereitstellt, deren Befruchtbarkeit sowie Entwicklungskompetenz leicht bestimmbar sind. Sowie zweitens, für welches cDNA Microarray Chips zur Transkriptomanalyse zur Verfügung stehen.

Es wurde der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* gewählt, der als Lieblingstier zum Studium der Embryogenese in Vertebraten als auch für genetische Fragestellungen gilt (Sive *et al.*, 2000; Beck und Slack, 2001; Showell und Conlon, 2007). *Xenopus* kann zu jeder Jahreszeit durch einfache Hormoninjektion zur Ovulation und Ablage hunderter von Eiern induziert werden. Diese lassen sich leicht mit einer Spermiesuspension *in vitro* befruchten. Die Embryonen sind robust und entwickeln sich außerhalb des Muttertieres in Leitungswasser, wo sie aufgrund ihrer Transparenz in ihrer Embryonalentwicklung sehr gut zu analysieren sind. Obwohl zahlreiche Vorgänge der Oogenese und Embryologie zuerst bzw. am besten in *Xenopus laevis* untersucht wurden, war der wesentlich kleinere *X. tropicalis* für die Thematik dieser Arbeit vorzuziehen. Erstens ist das diploide Genom von *X. tropicalis* mit 1,7 Gbp auf 10 Chromosomenpaaren sequenziert (Hellsten *et al.*, 2010) und auf dem Genome Browser der Universität von Santa Cruz (UCSC) abrufbar. Das pseudotetraploide Genom von *X. laevis* mit 3,1 Gbp auf 18 Chromosomenpaaren ist dagegen nicht sequenziert. Zweitens sind Microarray Chips für *X. tropicalis* mit 58.000 Sondensätzen wesentlich umfangreicher als für *X. laevis* mit nur 14.000 Sondensätzen. Und drittens wurden bei *X. tropicalis* Änderungen im

Adenylierungsgrad maternaler mRNA während der Eireifung bzw. in den ersten Zellteilungen nach Befruchtung umfangreich analysiert (Graindorge *et al.*, 2006).

Die Ziele dieser Arbeit waren wie folgt:

- I. Weil die postovulatorische Eialterung bei *Xenopus tropicalis* bisher nicht untersucht wurde, musste das Modellsystem als Erstes etabliert werden. Unter welchen Bedingungen können Eizellen am besten gealtert werden? Wie und über welchen Zeitraum erfolgt der Eipotenzialverlust. Lässt die Eizelle von außen erkennen, dass sie altert? Wie lange bleibt diese befruchtungsfähig? Ab wann ist eine normale Embryonalentwicklung nicht mehr gewährleistet?
- II. Da gealterte Säugeroozyten Abweichungen in der DNA Methylierung einzelner Gene aufwiesen, war es von Interesse, ob die Eialterung beim Frosch einen Einfluss auf das DNA Methylierungsmuster spezifischer Gene besitzt. In *Xenopus tropicalis* war zu diesem Zeitpunkt die DNA Methylierung bestimmter Genabschnitte nicht analysiert worden. In dem nah verwandten *Xenopus laevis* war jedoch die DNA Methylierung spezifischer Regionen der Gene *Xbra*, *c-Myc* und *cardiac Actin* bekannt. Es sollte daher die Methylierungsanalyse dieser 3 Gene in *Xenopus tropicalis* etabliert und das Methylierungsmuster in Embryonen aus frischen und gealterten Eiern über die Bisulfitsequenzierung analysiert werden.
- III. Als drittes Ziel der Arbeit war zu klären, ob die Eialterung Einfluss auf die Vorräte maternaler mRNA nimmt. Falls ja, in wie weit werden diese im Laufe des Alterungsprozesses verändert? Handelt es sich hier um spezifische Transkripte? Was sind deren Charakteristika? Hierzu sollte mittels Microarray und qRT-PCR die Menge polyadenylierter maternaler mRNA von frischen und gealterten Eiern verglichen und eventuelle Änderungen des Transkriptomes klassifiziert werden.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *pro analysis* Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Enzyme bzw. Kits für RNA und DNA Analysen stammten von den Firmen Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien, USA), Applied Biosystems (Darmstadt), Eurofins MWG Operon (Ebersberg), GE Healthcare (München), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Roche (Mannheim).

2.1 Postovulatorische Eialterung

2.1.1 Gewinnung von Eizellen und Embryonen

Adulte *Xenopus tropicalis* Weibchen wurden durch Injektion von 10 Einheiten humanem Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack am Abend vorstimuliert und am nächsten Morgen durch 100 U hCG zur Ovulation induziert. Nach ca. 3 - 4 h, sobald die ersten Eier spontan abgelegt wurden, konnte durch leichten Druck aufs Abdomen sowie den unteren Rücken des Weibchens eine Ablage von ca. 400 - 1000 Eiern erzielt werden. Die Eier wurden, wenn nicht anders angegeben, in Modified Barth Solution (MBS) gesammelt, dem tags zuvor 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA; Sigma A-7888) zugegeben wurde. Die Eier jeder einzelnen Eiablage wurden sorgfältig gemischt, in Aliquots von 100 - 500 Eier unterteilt und entweder unmittelbar oder nach 3 h bei 25 °C besamt. Zur Besamung wurden die Eier unterm Binokular visuell auf Qualität überprüft, das vorhandene MBS so effizient wie möglich entfernt und eine Spermiesuspension untergemischt. Für frische sowie gealterte Eier des gleichen Weibchens wurde stets die gleiche Spermiesuspension verwendet, die durch das Mörsern von Hoden in MBS mit 0,5 % BSA hergestellt und bei 14 °C aufbewahrt wurde. Nach einer 2-minütigen Inkubation in der Spermiesuspension wurde abgestandenes Leitungswasser hinzugegeben, um eine normale Embryonalentwicklung zu gewährleisten. Zur späteren Genexpressionsanalyse wurden unmittelbar kurz vor Zugabe der Spermiesuspension Aliquots von je 10 unbefruchteten Eiern gesammelt, zur

späteren DNA Methylierungsanalyse Aliquots von je 5 Blastula bzw. Gastrula, visuell auf Qualität überprüft, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

1x MBS-Puffer (Sive *et al.*, 2000):

88 mM NaCl; 1 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 1 mM MgSO₄; 5 mM HEPES; 2,5 mM NaHCO₃; 0,7 mM CaCl₂ (pH 7,8)

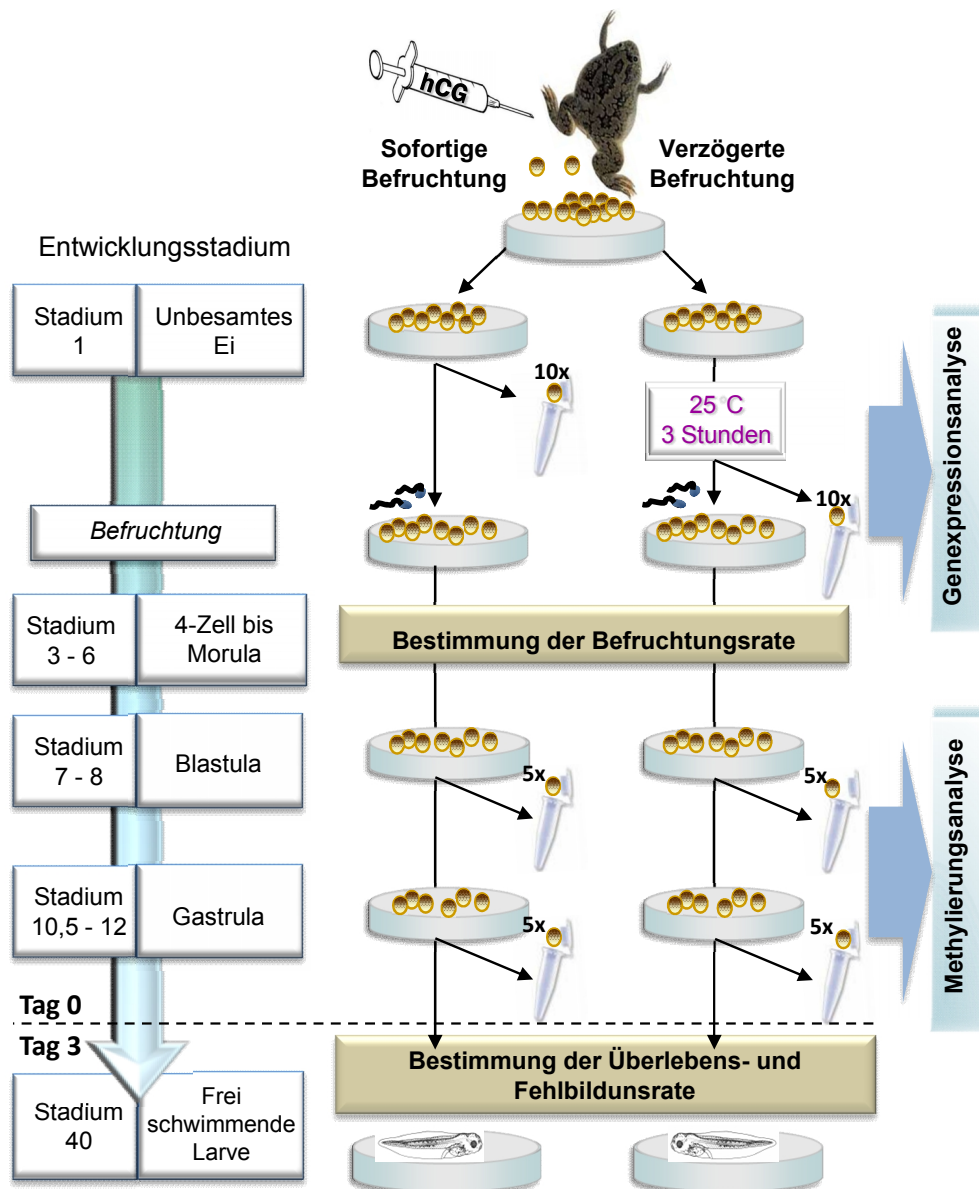


Abb. 1: Übersichtsschema zum Versuchsaufbau der postovulatorischen Eialterung, Bestimmung des Eipotenziales und Gewinnung von Proben für weitere molekulare Analysen.

Zur Erläuterung siehe Kapitel 2.1. Die in Ziffern angegebenen Entwicklungsstadien, in denen Embryonen verwendet bzw. analysiert wurden, richten sich nach Nieuwkoop und Faber, 1975.

2.1.2 Bestimmung des Eizellenpotenzials

Das Potenzial einer Eizelle wurde anhand ihrer Befruchtbarkeit sowie Fähigkeit zur normalen Embryonalentwicklung bewertet. Die Befruchtungsrate wurde zwischen dem 4-Zell- und Morulastadium (Stadium 3 - 6) als Anteil sich teilender Eier bestimmt. Die Überlebensrate wurde 3 Tage nach Befruchtung aufgezeichnet als Anteil der befruchteten Eier, die das Stadium der freischwimmenden Larve (Stadium 40) erreicht haben. In diesem Stadium ist die Organogenese abgeschlossen. Die Fehlbildungsrate entspricht dem Anteil an Larven des Stadiums 40, die ein oder mehrere morphologische Fehlbildungen besaßen. Die Rate an unterentwickelten Larven gibt den Anteil der das Stadium 40 erreichten Larven wieder, die im Vergleich zu ihren Altersgenossen eine um ca. 20 - 30 % kleinere Körpergröße bei gleichen Proportionen besaßen und keine Missbildungen zeigten. Die Embryonen wurden bei 23 °C inkubiert. Tote Eier bzw. Embryonen wurden regelmäßig entfernt, indem sich teilende Eier bzw. lebende Embryonen in frische Schalen transferiert wurden.

2.2 DNA Methylierungsanalyse

Zur Bestimmung der Methylierung von CpG bedient man sich einer Bisulfitbehandlung von genomischer DNA. Dabei bildet das Bisulfit mit dem unmethylierten Cytosin über sein C6-Atom ein Addukt, das zur Desaminierung und Umwandlung des Cytosins in Uracil führt. Methylierte Cytosine sind dagegen vor einer Umwandlung durch das Bisulfit geschützt. Durch die Bisulfitkonvertierung der denaturierten DNA wird die Sequenz einzelstrangspezifisch verändert, wodurch die Stränge nicht mehr komplementär zueinander sind. In der nachfolgenden PCR kann daher jeweils der sense oder antisense Strang analysiert werden, wobei das Uracil durch Thymin ersetzt wird. Die so entstehenden spezifischen Unterschiede zwischen methylierten und unmethylierten CpG erlauben durch die direkte Sequenzierung der PCR Produkte den Methylierungsstatus der jeweiligen Genregion abzuleiten.

2.2.1 DNA Isolierung

Bestimmung der DNA Konzentration bzw. Kontrolle der Reinheit isolierter DNA erfolgte spektroskopisch im NanoDrop-Gerät (ND-1000, Thermo Scientific, Waltham,

Massachusetts, USA). Die Reinheit der DNA kann anhand von Absorptionsspektren bzw. am Quotienten der Absorption bei 260 nm zu 280 nm mit einem Optimalwert von 1,8 - 2,0 abgelesen werden. Zur Auftrennung von DNA wurden 0,8 - 1,8 % Agarosegele verwendet, die mit der PeqGOLD Universal Agarose und TAE Puffer hergestellt wurden.

TAE-Puffer:

40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

6x DNA Probenpuffer:

0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA

2.2.1.1 Phenol/Chloroform Extraktion genomischer DNA

DNA Präparation aus Blastula bzw. Gastrula

20 Embryonen wurden mit 200 µl Proteinase K Puffer über Nacht bei 55 °C lysiert. Die Lösung wurde mit 50 µg RNaseA (Roche) für 45 min bei 37 °C verdaut und nach Zugabe von 13 µl 0,5 M EDTA für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die mittlere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Dotterextraktion 1 Vol. 1,1,2 Trichlor-Trifluorethan (Sigma) zugegeben und für 15 s gevortext. Nach 3 min bei 12.000 g und 4 °C wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit 0,5 Vol. Wasser verdünnt. Mit weiteren 50 µg RNaseA wurde erneut für 30 min verdaut und anschließend die genomische DNA durch Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) extrahiert. Hierzu wurde die DNA/Phenol-Lösung gevortext und bei 9.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde erneut mit 1 Vol. Chloroform bei 9.000 rpm für 5 min extrahiert. Aus der oberen Phase wurde mit 0,1 Vol. 5 M Ammoniumacetat und 1 Vol. Isopropanol bei -20 °C über Nacht die DNA gefällt. Die präzipitierte DNA wurde für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C sedimentiert, anschließend 2 mal mit 1 Vol. 70 % Ethanol je 10 min bei 13.000 rpm gewaschen und in 35 µl TE Puffer (pH 8,0) durch Schütteln bei 55 °C für 15 min resuspendiert.

1x Proteinase K-Puffer:

10 mM TRIS (pH 7,5); 1 mM MgCl₂; 10 mM NaCl; 2 % SDS; 1 mg/ml Proteinase K (Merck)

TE-Puffer:

10 mM TRIS (pH 7,5); 1 mM EDTA

DNA Präparation aus Blutzellen

1 - 2 Tropfen Blut wurden durch Herzpunktion eines adulten Frosches entnommen und sofort in 2 ml 3,2 % Natriumcitrat suspendiert. Blutzellen wurden bei 4000 rpm für 5 min bei 2 °C sedimentiert und in 2 ml 3,2 % Natriumcitrat bei 4000 rpm für 5 min 2 °C gewaschen. Die Zellen wurden in 1,5 ml RSB-Puffer aufgewirbelt und durch Zugabe von 30 µl 10 % Triton X100 lysiert. Kerne wurden bei 4000 rpm für 10 min bei 2 °C sedimentiert und in 2 ml SSC-Puffer aufgenommen. Die Kerne wurden durch Zugabe von 0,2 ml 10 % SDS aufgeschlossen. Die genomische DNA wurde extrahiert durch Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) und einer Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min, nachdem die Phenol/DNA Lösung für 30 min geschüttelt wurde. Die wässrige Phase wurde abgenommen und durch Zufügen von 1 Vol. Ethanol die DNA präzipitiert und auf einem Glasstab aufgespult. Die DNA wurde 2 mal im 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

RSB-Puffer:

10 mM NaCl; 10 mM TRIS-HCl (pH 8); 5 mM MgCl₂

SSC-Puffer:

150 mM NaCl; 15 mM Natriumcitrat; 50 mM TRIS(pH 8,5); 2 mM EDTA

2.2.1.2 DNA Isolierung mittels DNA Kit

Genomische DNA wurde aus je 5 Blastula bzw. Gastrula mit Hilfe des PeqGOLD Microspin Tissue DNA Kit (Pepylab) inklusive eines zusätzlichen Verdauers mit RNaseA (Roche) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eluiert wurde die DNA mit 50 µl Wasser.

2.2.2 Bisulfitbehandlung genomischer DNA

Für die Bisulfitbehandlung wurde die gesamte DNA Präparation von 50 µl aus 2.2.1.2 eingesetzt, was ca. 0,5 bis 2 µg DNA entsprach. Da die Bisulfitkonvertierung nur an einzelsträngiger DNA funktioniert, wurden der DNA zunächst 5,5 µl 3 M NaOH

zugegeben und diese nach einer Inkubation für 15 min bei 37 °C für 2 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Bisulfitlösung wurde stets frisch angesetzt. Hierzu wurden 4,25 g Natriumbisulfit in 7,5 ml Wasser gelöst. Nach der Zugabe von 450 µl 50 mM Hydrochinon und 500 µl 10 M NaOH wurde die Lösung auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt. 500 µl dieser Bisulfitlösung wurden der einzelsträngigen DNA zugegeben und diese bei 50 °C für 16 - 20 h im Dunkeln konvertiert. Anschließend wurde die bisulfitbehandelte DNA im Wizard DNA Clean-Up System (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl eluiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde die DNA mit 5,5 µl 3 M NaOH für 15 min bei 37 °C inkubiert, mit 55 µl 6 M Ammoniumacetat (pH 7) wieder neutralisiert und mit 1 µl Glykogen (20 mg/ml) und 350 µl Ethanol für 15 min bei 13.000 rpm gefällt. Das Präzipitat wurde in 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und in 10 µl Wasser resuspendiert.

2.2.3 PCR bisulfitbehandelter DNA

Primer wurden so entworfen, dass sie ausschließlich an bisulfitkonvertierte DNA binden und keine CpG enthalten. Für *Xbra* und *c-Myc* wurde der sense-, für das *cardiac Actin* der antisense Strang untersucht. Da durch die Konvertierung der Cytosine in Uracile bei einer Sequenzierung mit forward Primer weitgehend Cytosinsignale fehlen bzw. bei einer Sequenzierung mit reverse Primer Guaninsignale kaum vorhanden sind, kann es zu falschen Signalverstärkungen kommen. Daher wurden den Primern Tags angefügt, die Cytosine bzw. Guanine enthalten.

Tab. 1: Zur Methylierungsanalyse verwendete PCR-Primer.

Die Sequenz der an forward (F) und reverse (R) Primer angefügten Tags ist in Großbuchstaben angegeben, die der bisulfitkonvertierten DNA komplementäre Primersequenz in Kleinbuchstaben angezeigt.

Genname		Primersequenz 5' - 3'
<i>Xbra</i>	F	CTTGCTTCCGGCACGAttttgatgagtgaagtgtt
	R	TGTAAAACGACGGCCAGTaaataaaaaaacctaattcttacctt
<i>c-Myc</i>	F	CTTGCTTCCGGCACGAtagtaggtaagagggttttgatttg
	R	TGTAAAACGACGGCCAGTcctcctcctacaataataacaac
<i>cardiac Actin</i>	F	CTTGCTTCCGGCACGAggtgtaagaaagatatattggtg
	R	TGTAAAACGACGGCCAGTaaaacctacaaacattcccta

Für die PCR wurde das Hot Star Taq Polymerase Kit (Qiagen) sowie ca. 5 ng bisulfitkonvertierte DNA eingesetzt, bei einer Annahme, dass 50 % der bisulfitbehandelten DNA durch die vorausgehende Aufreinigung verloren ginge. Die Reaktion erfolgte in 25 µl mit einer anfänglichen DNA Denaturierung und Aktivierung der Polymerase für 15 min bei 95 °C. Es folgten 36 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 52 °C für 45 s, 72 °C für 1 min und einer abschließenden Elongation bei 72 °C für 10 min. Für die nachfolgende Sequenzierung wurden die PCR Produkte auf einem 1,8 % Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des MiniElute Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers geleluert.

2.2.4 Sequenzierung

Sequenziert wurden je 10 bis 20 ng aufgereinigtes PCR Produkt mit dem BigDyes Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) und 5 pmol Forward-Tag 5'-CTTGCTTCCGGCACG-3' bzw. Revers-Tag 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' Primer in einem 10 µl Reaktionsvolumen nach Sanger. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach einer anfänglichen Denaturierung bei 96 °C für 1 min mit 25 Zyklen: 96 °C für 10 s, 56 °C für 5 s und 60 °C für 4 min. Der Reaktionsansatz wurde über Sephadexsäulen (GE Healthcare) aufgereinigt und im ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit Hilfe der "Sequencing Analysis" Software (Applied Biosystems) analysiert.

2.3 Analyse maternaler mRNA

Quantifizierung sowie Beurteilung des Reinheitsgrades über den Extinktionsquotienten isolierter RNA erfolgte im NanoDrop-Gerät (ND-1000, Thermo Scientific).

2.3.1 RNA Isolierung

2.3.1.1 RNA Isolierung mittels Trizolreagenz

10 unbefruchtete Eier wurden mit 500 µl PeqGOLD RNAPure (Pqlab), einem Trizolreagenz versetzt und bei 5000 rpm für 5 s im Precellys Homogenisator (Pqlab) lysiert. Nach Zugabe von 50 µl Chloroform wurde das Lysat für 20 s geschüttelt und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. In Phaselockgefäßen (Eppendorf) erfolgte

dann bei 13.000 rpm für 5 min die Trennung der Phasen. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA wurde mit 1 Vol. Isopropanol für 30 min auf Eis gefällt und anschließend bei 13.000 rpm für 5 min pelletiert. Die RNA wurde mit 300 µl 70 % Ethanol je 2 mal für 15 min bei 13.000 rpm gewaschen und in 21 µl DEPC Wasser aufgenommen.

2.3.1.2 RNA Isolierung mittels PqGOLD Total RNA Isolierung Kit

Wenn nicht anders angegeben, wurden zur Isolierung totaler RNA jeweils 10 unbefruchtete Eier im Precellys Homogenisator (Peglab) für 5 s bei 5000 rpm in 400 µl Lysispuffer aufgeschlossen und weiter mittels des PqGOLD Total RNA Isolierung Kits (Peglab) nach Herstellerangaben RNA extrahiert. Zusätzlich wurden zum Abbau genomischer DNA die auf Säule gebundene RNA mit DNase I (Peglab) nach Herstellerangaben behandelt. Aus 10 unbefruchteten Eiern konnten 8 - 12 µg totaler RNA isoliert werden.

2.3.2 Microarray Analyse

Es wurde das *Xenopus tropicalis* Genome Array von Affymetrix mit 58.000 SONDENSÄTZEN verwendet, die 51.000 Transkripten entsprechen. Ein SONDENSATZ besteht aus verschiedenen Oligonukleotid-Probenpaaren, die aus einer *Perfect Match*-Zelle, die zu dem entsprechenden Gen, die es repräsentiert 100 % komplementär ist, und einer *Missmatch*-Zelle, die eine Mutation beinhaltet, bestehen. Dadurch können Hintergrund sowie nicht spezifische Hybridisierungen korrigiert werden.

Die Qualität der totalen RNA für die Microarrays wurde vorab auf einem Agilent Chip bzw. die Qualität der entsprechenden cRNA auf dem Qiaxcel Chip nach Herstellerangaben überprüft. Es konnten keine Qualitätsmängel bzw. –Unterschiede zwischen einzelnen Proben festgestellt werden. 100 ng totaler RNA wurden mit Oligo(dT) Primern, die eine T7 RNA-Polymerase Bindestelle enthielten, in doppelsträngige cDNA konvertiert, amplifiziert und mit einer T7 RNA-Polymerase im GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix) in biotinmarkierte cRNA *in vitro* transkribiert. Hierdurch wurde nur polyadenylierte mRNA in markierte cRNA umgeschrieben. Diese wurde aufgereinigt, fragmentiert und auf dem *Xenopus*

tropicalis Genome Array hybridisiert. Nicht komplementäre cRNA wurde ausgewaschen und die komplementären cRNA fluoreszenzmarkiert. Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Gescannt wurden die Arrays im GeneChip Scanner 3000 G7 (Affymetrix). Mithilfe der Affymetrix GCOS1.4 Software (MAS 5.0 statistical algorithm) wurden die *detection calls* als *present* (präsent), *absent* (fehlend) oder *marginal* (grenzwertig) zu jedem Sondensatz bestimmt. Die Intensitäten jedes Arrays wurde auf eine Zielintensität von 1000 normiert, um Unterschiede in Menge bzw. Qualität der cRNA-Proben sowie andere experimentelle Variablen nicht biologischen Ursprungs zu kompensieren. Paarweise Vergleiche des Transkriptomes zwischen frischen und gealterten Eiern wurden mit der GCOS1.4 Software analysiert, die die Signifikanz der Signalstärkenänderungen (*change p-value*) zwischen den einzelnen Proben über den Wilcoxon Ranking Test bestimmt. Um falsch positive Änderungen zu minimieren, wurden nur die veränderten Sondensätze zur weiteren Analyse genommen, die in frischen, in gealterten oder in beiden ein *present detection call* hatten. Es wurden insgesamt zwei Arrays mit RNA aus frischen Eiern und zwei Arrays mit RNA aus gealterten Eiern gegeneinander verglichen. Die 4 Kreuzvergleiche von frischen gegen gealterte Eizellen wurden zu einem Datensatz zusammengefasst, indem nur diejenigen Sondensätze gezählt wurden, die in allen 4 Vergleichen konstant waren, d.h. 4 mal reduziert, 4 mal erhöht bzw. 4 mal als nicht verändert gemessen wurden. Das bedeutet, Sondensätze, die z.B. in 3 von 4 Vergleichen verändert bzw. nicht verändert waren, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

cRNA-Synthese, Hybridisierung, Scannen sowie Erstellung der Rohdatei wurde dabei durch das BioChip Labor, Institut für Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen unter Leitung von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass durchgeführt. Die Microarray Daten sind dem NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) zugefügt worden und können unter der Zugangsnummer GSE21109 abgerufen werden.

2.3.3 Gen-Ontologie Analyse

Die Gen-Ontologie (GO) Analyse wurde mithilfe des Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit (GO EAST) (Zheng und Wang, 2008) durchgeführt. Dieses vergleicht das Verhältnis (*log odds ratio*, LR) Anzahl ausgewählter Sondensätze einer bestimmten GO (q) zur Gesamtanzahl der ausgewählten Sondensätze (k) mit

der Anzahl aller auf dem Chip befindlicher SONDENSÄTZE dieser GO (m) zu der Gesamtanzahl der auf dem Chip befindlicher SONDENSÄTZE (t) nach der Gleichung:

$$LR = \log_2 \left(\frac{q/k}{m/t} \right)$$

2.3.4 Relative quantitative reverse Transkription Echtzeit PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der relativen Menge an maternaler mRNA in unbefruchteten Eiern wurden 500 ng totaler RNA mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Zur Analyse ausschließlich polyadenylierter mRNA wurden zur cDNA Synthese *anchored* Oligo(dT)₂₀ Primer (Invitrogen) verwendet, zur Bestimmung der mRNA unabhängig vom Polyadenylierungsgrad dagegen *random* Hexanukleotide. Die qRT-PCR wurde mit POWER SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA während der Amplifizierung und emittiert Licht nach jedem Zyklus proportional zur Menge am PCR Produkt. In Abhängigkeit von der anfänglichen Menge der cDNA nimmt die Fluoreszenz ab einem bestimmten Zyklus exponentiell zu. Der Zyklus, in dem die Amplifikationskurve im exponentiellen Bereich einen festgelegten Schwellenwert schneidet, wird Ct-Wert (*threshold cycle*) genannt (Dorak, 2006). Da SYBR Green sequenzunspezifisch interkaliert und dadurch Fluoreszenzsignale auch auf mögliche doppelsträngige Primer-Nebenprodukte zurückzuführen wären, wurde nach der PCR eine Dissoziationspunktanalyse angefügt. Da Nebenprodukte kürzer sind als das Amplicon haben sie eine geringere Schmelztemperatur, so dass Primer-Nebenprodukte anhand zusätzlicher, bei niedrigeren Temperaturen als das Amplicon detektierbaren Schmelzkurven zu erkennen gewesen wären.

Pro Reaktion wurden in einer 384 well Platte 1 ng cDNA bzw. 1 ng totaler RNA als -RT Kontrolle, 3 pmol genspezifische Primer (Tab. 2) und das SYBR Green Master Mix in einem Volumen von 10 µl eingesetzt, bei Verwendung von 96 well Platten entsprechend doppelte Mengen in einem Volumen von 20 µl. Nach einer Inkubation von 10 min bei 95 °C folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C und 60 s bei 60 °C. Amplifizierung und Fluoreszenzdetektion erfolgte im 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) in einer Doppelbestimmung. Eine Amplifizierung genomischer DNA wurde anhand negativer -RT Kontrollen ausgeschlossen.

Tab. 2: In qRT-PCR analysierte Transkripte.

Angegeben ist für jede in qRT-PCR untersuchte mRNA die jeweilige *forward* (F) sowie *reverse* (R) Primersequenz. mRNA Bezeichnung, Ref-Seq Transkript ID sowie Gen-Name wurden der Affymetrix na30 Genannotation vom 23 November 2009 durch die Zuordnung der Affymetrix Sondensatz ID erhalten. Die zugehörige Gen-Funktion bzw. biologischer Prozess, in das die Gene involviert sind, stammen aus der NCBI-Gen-Datenbank, aus Xenbase (Bowes *et al.*, 2010) sowie aus GO EAST (Zheng und Wang, 2008). Die mRNA MGC75766 und eno1 wurden in Graindorge *et al.*, 2006 während der Eireifung sowie nach Befruchtung als deadenyliert beschrieben. (Tabelle modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

mRNA	Primersequenz 5' - 3'	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	Gen-Funktion / biologischer Prozess	Affymetrix Sondensatz ID
tpi1	F ATCAACGCCAAGCAATAACC R GGCCGCGTCACTTATTCTAA	NM_001114234	Triosephosphate isomerase 1	Glycolyse/Gluconeogenese; Fettsäurebiosynthese; Mannose-, Fruktose- und Inositolphosphat-Stoffwechsel	Str.52176.1.S1_at
atp5a1	F TGGAAAGATCTCCGAACAGG R AAAGTGGTGGCAGAAAAACG	NM_001030439	atp5a1 protein	ATP-Synthese gekoppelter Protonentransport; mitochondrialer F1-Komplex	Str.2749.1.S1_at
MGC75766	F AAAAGGAGAGCATTGCCAAA R GACAGATGGAGCCTGCAGAT	NM_203787	ATP synthase subunit B	ATP-Synthese gekoppelter Protonentransport; mitochondrialer F0-Komplex	Str.27670.1.S1_at
TGas042k2 0.1	F CTTGGTACGTCCCAGTTTGG R CAAATCGAAACAGACGAGCA	NM_203811	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit (hadhb)	Stoffwechsel von Lipiden, Lipoproteinen und Aminosäuren (trifunktionales Enzym)	Str.20522.1.S1_s_at
TGas064h0 9.1	F TGTGGCCAAACAAACAAAGA R GTCAAACAGGGAAGGGAACA	NM_001016551	prohibitin 2	Transkription; DNA abhängige Transkriptionsregulierung	Str.1047.1.S1_at
slc34a2	F TTGCTGGGAATGATCTGATG R CGGGGCAGTTTTATTTTCA	NM_203971	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	Phosphatase-Transport	Str.27160.3.S1_a_at
EIF3S9	F CCTGCTGGATCATCTTGTGA R CGCTGCTTCATTGCTATTCA	NM_001016724	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	Translationsbeginn	Str.6777.1.S1_at
pelo	F AGTCAAGCTCCGACGATGAT R CTATTTCTTTGCCCGGTGAC	NM_001004823	pelota homolog	Translation; Zellzykluskontrolle; meiotische Zellteilung	Str.15516.1.S1_a_at

mRNA	Primersequenz 5' - 3'	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	Gen-Funktion / biologischer Prozess	Affymetrix Sondensatz ID
tubb2c	F GAAGGGGAAGAGGAGGAAAA R TGAAACCGGAGAGAGAAGGA	NM_001078982	tubulin, beta 2C	Mikrotubuli vermittelter Transport; Proteinpolymerisation	Str.8814.1.S1_x_at
sdhb	F GGCGACGTACAAGGAGAGAG R CGGAAGTGCCTAGAAATCACA	NM_001126528	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Citratzyklus; Elektronentransportkette; Oxidation/Reduktion	StrEns.9993.1.S1_at
TNeu126i0 7.1	F ATGGGATCACATCAAGCACA R CCTTGGATGAAGTGCCAGTC	NM_001044430	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (ucrc)	Mitochondrialer Elektronentransport von Ubiquinol auf Cytochrom C	Str.52223.1.S1_at
mrpl22	F AGCCGTACGGAATCACAATG R CATGCCACGTCCATGATAAC	NM_001079446	Mitochondrial ribosomal protein L22	Translation, strukturelle Komponente von Ribosomen	Str.17424.1.S1_at
LOC394441	F CTGTGTCCGGAATGAAGAT R AGGGTCAGCTTCTGGGAAAT	NM_203519	egg cortical granule lectin	Signaltransduktion	Str.115.1.S1_at
eno1	F CTCTCCCAGCATAACCTTGC R CTACATGCAGGCACCAAGTGT	NM_203813	enolase 1, (alpha)	Glycolyse; Phosphopyruvathydratase	Str.5337.1.S1_at
TEgg053p2 1.1	F AACATAAAATCAAGCAACTTTCCA R GGATAGGCAGAACTGCTTTC	NM_001004842	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast)	checkpoint Protein der Mitotischen Spindel; DNA abhängige DNA Polymerase; DNA Reparatur; Progesteron-vermittelte Eireifung;	Str.12948.1.S2_at
nop5	F GAAGAACCTTCCACCAGCAC R TTTCTTTCCTACTCATCATCCTCC	NM_203967	Nucleolar protein 5	Biogenese von Ribosomen	Str.2215.1.S1_at
odc1	F GACTGTGAGATGGGGTCACA R CACAAGCTACAAATGCTTGAGTG	NM_001005441	Ornithine decarboxylase 1	geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Polyamin-Biosynthese	Str.6672.1.S1_at

Die Transkriptmenge wurde relativ quantifiziert nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode nach Livak und Schmittgen, 2001 mit Ornithin Decarboxylase (odc) kodierender mRNA als Referenz. Hierzu wurde vom C_t -Wert der zu untersuchenden Transkripte zunächst der C_t -Wert von odc subtrahiert und anschließend der ΔC_t -Wert der frischen Eier vom ΔC_t -Wert der gealterten Eier subtrahiert. Die n^2 potenzierte Differenz ergab die fache Minderung der Transkriptsignale in gealterten Eizellen, die einer fachen Änderung der Menge des jeweiligen Transkriptes bzw. des polyadenylierten Transkriptes entspricht.

2.3.5 Bestimmung der PolyA-Längen mit dem RNA-Ligation-PolyA-Test (RL-PAT)

Um die PolyA-Länge einer mRNA zu bestimmen wurde ein RNA Oligo (Primer P1), das an seinem 5'Ende ein Phosphatrest besitzt, an das 3'Ende der mRNA ligiert. Um auszuschließen, dass dieses Oligo an eine bereits ligierte RNA ligiert, wurde das 3'Oligoende mit einer Aminogruppe modifiziert und dadurch eine weitere Ligation blockiert. Ligiert wurden 0,8 - 1 μ g totaler RNA mit 0,4 μ g Primer P1 mit Hilfe von 20 U T4 RNA Ligase (New England Biolabs) für 30 min bei 37 °C in einem 10 μ l Reaktionsvolumen. 5 μ l dieser ligierten RNA wurden dann mit 0,4 μ g dem zu P1 komplementären Primer P'1 und dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für die nachfolgende PCR wurden genspezifische forward Primer und der Primer P'1 als reverse Primer verwendet. Amplifiziert wurde mit der Hot Star Taq Polymerase (Qiagen) nach Herstellerangaben für 38 Zyklen bei einer *Annealing* Temperatur von 56 °C in einem 25 μ l Reaktionsvolumen. Alle Primer sind in Tab. 3 aufgelistet und wurden mit Ausnahme von Primer P1 (Eurofins) von Invitrogen bezogen.

Mit diesem RNA-Ligation-PolyA-Test (RL-PAT) (Rassa et al., 2000; Charlesworth *et al.*, 2004) ist es möglich, relative Veränderungen in der PolyA-Länge eines Transkriptes zu bestimmen. Um die tatsächliche Länge zu quantifizieren, wurden zusätzlich vor der Ligation 0,8 μ g totaler RNA mit 0,3 μ g Oligo(dT)₂₀ und 5 U RNaseH (New England Biolabs) für 30 min bei 37 °C und 2 min bei 65 °C in einem 8 μ l Reaktionsvolumen vollständig deadenyliert. Hierbei bilden die Oligo(dT)₂₀ mit dem PolyA ein DNA-RNA Hybrid, das von der RNaseH abgespalten wird.

Tab. 3: Für RL-PAT verwendete Primer.

P1 ist ein phosphoryliertes (P) und aminogeblocktes (NH₂) RNA Oligo. Das P'1 ist ein zu P1 komplementäres DNA Oligo. Die genspezifischen Primer entsprechen jeweils dem forward Primer. Ref-Seq Transkript ID und Transkriptbezeichnung folgen der na30 Affymetrix Annotation vom November 23, 2009.

mRNA	Ref-Seq Transkript ID	Primersequenz 5' - 3'
P1		P-GGTACCTTGATCTGAAGC-NH ₂
P'1		GCTTCACATCAAGGTGACCTTTTT
atp5a1	NM_001030439	TGGAAAGATCTCCGAACAGG
tpi1	NM_203787	ATCAACGCCAAGCAATAACC
eif3s9	NM_001016724	CCTGCTGGATCATCTTGTGA
grhpr	NM_001007895	AAGCAGCATGACATCTAATGGA
odc1	NM_001005441	GACTGTGAGATGGGGTCACA
melk	NM_001016390	TCCTCTCTGATTCACATGGTGT
TEgg053p21.1	NM_001004842	AACATAAAATCAAGCAACTTTCCA
nop5	NM_203967	AGACTCACAATGACTCTTTAGCATAAACC
tmem85	NM_203545	TTGGCATTAGCTGTCTACAAGTG

Aufgetrennt wurden die PCR-Produkte des RL-PAT in 3 % Gelen, hergestellt mit der Biozym Phor Agarose in TBE Puffer.

TBE-Puffer:

89 mM TRIS (pH 8); 89 mM Borat; 2 mM EDTA

2.3.6 Präparation vom Eiextrakt

Frisch abgelegte, unbefruchtete Eier wurden zur Entfernung der Gallerthülle in MBS mit 2 % Cystein für 2 min inkubiert und anschließend 2 mal im MBS und 2 mal im Extraktionspuffer gewaschen. Die enthüllten Eier wurden vorsichtig in ein Polyamer Röhrchen umgeführt und bei 20.000 g für 15 min zentrifugiert. Aus ca. 0,75 ml nicht enthüllten Eizellen konnten ca. 120 µl cytosolhaltiger Überstand gewonnen werden. Dieser wurde in 10 µl aliquotiert und entweder direkt oder nach 3 h Alterung bei 25 °C auf Trockeneis eingefroren.

1x Extraktionspuffer-Puffer:

50 mM Sucrose; 100 mM KCl; 0,1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM Hepes-KOH (pH 7.7)

2.3.7 *In silico* Analyse der 3'NTR

2.3.7.1 Bestimmung der 3'NTR-Länge

Alle Transkripte, deren Sondensätze in alten Eiern als reduziert, erhöht bzw. nicht verändert gemessen wurden und eine Ref-Seq Transkript ID enthielten, wurden auf ihre 3'NTR-Länge hin untersucht. Die 3'NTR-Länge ermittelte ich aus der Differenz der im Browser der *University of California, Santa Cruz* (UCSC) angegebenen *scaffold* Positionen von Anfang und Ende der jeweiligen 3'NTR. Die Zuordnung der Signaländerung zur 3'NTR-Länge erfolgte anhand der Ref-Seq Transkript ID.

2.3.7.2 Analyse der 3'NTR auf das Vorkommen cis-regulatorischer Elemente

Transkripte, deren Sondensätze in alten Eiern als signalreduziert oder signalerhöht gemessen wurden und eine Ref-Seq Transkript ID enthielten wurden auf das Vorkommen cis-regulatorischer Elemente untersucht. Hierzu bezog ich über die entsprechende Ref-Seq Transkript ID, die den jeweiligen Microarray-Sondensätzen in der Affymetrix na30 Annotation zugeordnet war, 3'NTR-Sequenzen aus dem UCSC Browser. Diese insgesamt 1095 3'NTR wurden auf das Vorkommen 7 regulatorischer cis-Elemente untersucht. Die zu suchenden Motivsequenzen wählte ich aus Quellen wie in Tab. 4 und Tab. 5 angegeben. Jede der insgesamt 36 Motivsequenzen wurde durch einen Algorithmus in der Sprache Perl, das von Katrin Rademacher, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Essen erstellt und angewendet wurde, einzeln auf ihr Vorkommen in den 3'NTR Sequenzen überprüft. Bei einem Treffer wurde die jeweilige Position der Motivsequenz innerhalb der 3'NTR sowie die Gesamtlänge der durchsuchten 3'NTR-Sequenz angezeigt. Für die Elemente TCS, MBE und CPE berücksichtigte ich zur Auswertung nur diejenigen Motive, die nicht mehr als 120 nt bzw. für PAS, die nicht mehr als 100 nt vom 3' Ende entfernt waren.

Tab. 4: In der 3'NTR gesuchte regulatorische Elemente.

Aufgelistet sind die für jedes cis-Element gesuchten Motivsequenzen. PAS wurde in den letzten 100 nt, CPE, TCS und MBE in den letzten 120 nt der 3'NTR-Sequenz aller veränderten Transkripte berücksichtigt. ARE und EDEN wurden in der gesamten 3'NTR gesucht. Für das EDEN wurde nur die Kernsequenz des EDEN15 Motivs gesucht. n steht dabei für jedes beliebige Nukleotid. Die Referenz gibt die Quelle der jeweiligen Motivsequenz an. Die NTR-Datenbank (UTR Site) ist über (<http://www2.ba.itb.cnr.it/UTRSite/>), die Transterm-Datenbank über (<http://uther.otago.ac.nz/>) zu finden.

Element	RNA bindendes Protein	gesuchte Sequenz	Referenz
MBE	Musashi	GUUUAGU; AUUUAGU; GUUAGU; AUUAGU; GUAGU; AUAGU	Arumugam <i>et al.</i> , 2010; MacNicol und MacNicol, 2010
TCS	unbekannt	AUUGUCU; AUUAUCU; UUUGUCU; UUUUAUCU	Wang <i>et al.</i> , 2008; MacNicol und MacNicol, 2010
CPE	CPEB	UUUUUAAU; UUUUUUAU; UUUUAUU; UUUUAAU; UUUUUAU; UUUUAU	Graindorge <i>et al.</i> , 2006; NTR- und Transterm Datenbank
kanonisches PAS	CPSF	AAUAAA	Tian <i>et al.</i> , 2005; Graindorge <i>et al.</i> , 2006;
nicht kanonisches PAS	unbekannt	AUUAAA; AGUAAA; UAUAAA; CAUAAA; GAUAAA; AAUAUA; AAUACA; AAUAGA; AAUGAA; ACUAAA; AACAAA; UUUAAA	Tian <i>et al.</i> , 2005; NTR-Datenbank
ARE	ARE-BP, ePAB	UAUUUAUAA; UAUUUUAUUAU; UAUUUUAUUA; UAUUUUAUUU; UUAUUUAU; UAUUUUAU	Graindorge <i>et al.</i> , 2006; Transterm Datenbank
EDEN	EDEN-BP	UGUnUGUnUGU	Graindorge <i>et al.</i> , 2008

Da viele Motivsequenzen mehrfach gefunden wurden bzw. da zusätzlich für alle cis-Elemente außer EDEN mehrere Motivsequenzen gesucht wurden, lagen pro Element oft zahlreiche Treffer vor, zum Teil überlagernd. Ich zählte dagegen nicht die Anzahl der insgesamt gefundenen Motivsequenzen an sich pro 3'NTR, sondern bestimmte die Anzahl der Transkripte einer jeweiligen Gruppe, die mindestens ein Motiv enthielten unabhängig von der Treffersumme der jeweiligen 3'NTR. Eine Ausnahme bildet das EDEN, das sehr selten vorkam. Hier wurde die Anzahl aller gefundenen Motive in einer Transkriptgruppe gegen die 3'NTR-Gesamtlänge der jeweiligen Transkriptgruppe normiert.

2.3.7.3 Zuordnung im Array bestimmter Sondensätze zu Transkriptkategorien

Sondensätze, deren Signalstärke in gealterten Eiern als reduziert, nicht verändert oder verstärkt bestimmt wurden, wurden den von Graindorge *et al.*, 2006 bestimmten 7 Transkriptkategorien zugewiesen. Hierzu wurden durch Prof. Dr. Gerhart Ryffel, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, den von Graindorge *et al.* 2006 in ihrem nicht kommerziellen Array verwendeten 50meren Oligonukleotidsequenzen über einen Nukleotid-BLAST in Xenbase (Bowes *et al.*, 2010) die entsprechenden Affymetrix Sondensatz ID zugeordnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von *Xenopus tropicalis* als Modellorganismus

Zum Studium der molekularen Vorgänge eines postovulatorisch alternden Eies wurde der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* als Modellorganismus gewählt. Da in *Xenopus* bisher Effekte einer verzögerten Befruchtung auf die Entwicklungskompetenz des Eies nicht untersucht worden sind, musste ich zunächst die methodischen Bedingungen zur Eialterung etablieren. Ovulation induzierte ich durch Injektion von humanem Choriongonadotropin (hCG) in den dorsalen Lymphsack des Weibchens und sammelte 100 - 1000 reife Eier pro Eiablage manuell. Diesen gab ich entweder sofort oder verspätet eine Spermiesuspension zu. Das Potenzial eines Eies wird über seine Fähigkeit definiert, befruchtet zu werden und sich zu einem normalen Embryo zu entwickeln. Daher bestimmte ich von frischen sowie gealterten Eiern die Befruchtungsrate als Zahl geteilter Eier im 4-Zell- bis Morulastadium, die Überlebensrate als Anzahl aller aus den befruchteten Eiern entwickelten Larven, die das Stadium 40 erreichten, sowie die Fehlbildungsrate, als Anteil der überlebenden Larven mit Missbildungen.

Es galt ein System zu etablieren, in dem Eier postovulatorisch altern, das heißt an Entwicklungspotenzial verlieren, aber noch gut befruchtbar bleiben. Ein Laichen ins Wasser, wie es in der Natur der Fall ist, führt in wenigen Minuten zu einer Quellung der Eigallerthülle, das ein Passieren des Spermiums inhibieren würde. Daher sammelte ich Eier manuell in eine feuchte Kammer, um einerseits das Quellen der Gallerthülle und andererseits ein Austrocknen der Eier zu verhindern. Einen Teil dieser Eier besamte ich sofort, die restlichen Eier dagegen 3 bzw. 5,2 h verspätet. Nach 3 h waren die Eier vermindert befruchtungsfähig und konnten nach 5,2 h nicht mehr befruchtet werden (Abb. 2A). Da die Eier jedoch stark zusammenklebten, konnte ich nicht beurteilen, ob die verminderte Befruchtungsfähigkeit der Eier an der Eialterung an sich lag oder an einer unzureichenden Benetzung mit der Spermiesuspension. Das Zusammenkleben der Eier erschwerte ebenfalls die anschließende visuelle Analyse sowie die Sortierung von befruchteten und nicht befruchteten Eiern erheblich. Dennoch konnte ich sehen, dass Larven aus 3 h

verspätet befruchteten Eiern viel seltener das Stadium 40 erreichten sowie häufiger fehlgebildet waren (Abb. 2A).

Da die Alterungsbedingungen in der feuchten Kammer nicht ideal waren, sammelte ich Eier in die Modified Barth Solution (MBS), eine Salzlösung. Diese erlaubte eine gleichmäßige Verteilung sowie Benetzung der Eier mit der Spermiesuspension, weshalb alle weiteren Experimente in MBS durchgeführt wurden. Um Änderungen im Eipotenzial über einen Zeitraum zu bestimmen, wurden Eier in MBS 3,3 - 6,3 h gealtert. Während bis ca. 3,8 h die Befruchtungsrate sehr gut blieb, sank diese ab 5,4 h signifikant (Abb. 2B). Gleichzeitig erreichte bei 3,3 und 3,8 h verspätet befruchteten Eiern im Vergleich zu frisch befruchteten Eiern weniger als die Hälfte der Embryonen das Stadium 40, während Embryonen aus 5,4 und 6,3 h gealterten Eier alle während der frühen Embryonalentwicklung verstarben. Auch zeigten Larven aus verspätet befruchteten Eiern einen signifikant hohen Anstieg in der Fehlbildungsrate. Die beobachteten Missbildungen wiesen auch innerhalb derselben Eiablage eine hohe Variabilität auf: Ödeme, Acephalien, gestauchte Köpfe und Rücken, verdrehte oder geknickte Schwänze, Zyklopen oder stark verkleinerte Augen, anormale Darmentwicklungen sowie Mischformen (Abb. 2C). Zusätzlich fiel mir auf, dass Larven aus gealterten Eiern, die keine Fehlbildungen erhielten, in Größe und Entwicklung retardiert waren (Abb. 2D).

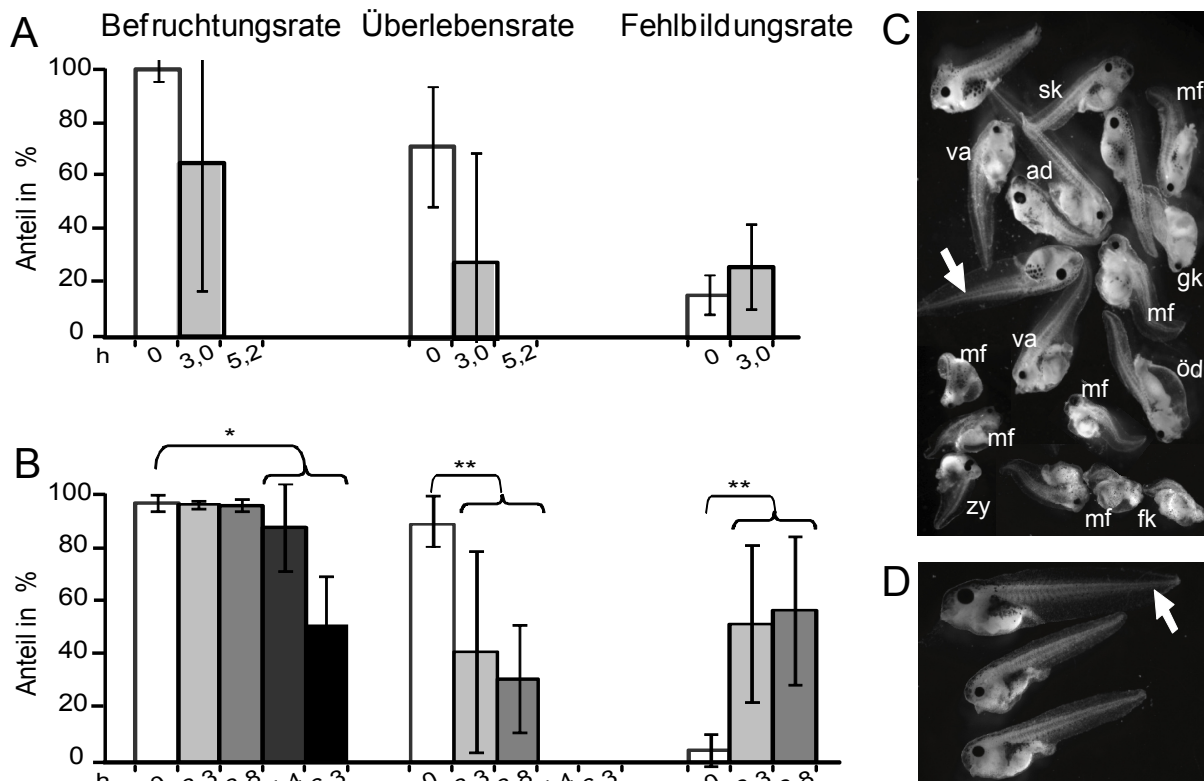


Abb. 2: Einfluss postovulatorischer Alterung auf die Eiqualität.

(A+B) Eier wurden entweder sofort nach Eiablage (weiße Balken) oder wie angezeigt verzögert (hell- bis dunkelgraue Balken) besamt. Die Eiablage sowie Alterung erfolgten in einer feuchten Kammer (A) oder in MBS (B). Die Befruchtungsrate wurde bestimmt im 4-Zell- bis Morula- Stadium, die Überlebens- und Fehlbildungsrate 3 Tage später im Stadium 40. In (A) waren über 5 h gealterte Eier nicht mehr befruchtbar. (B) Alle der aus über 5 h gealterten Eiern sich entwickelnden Embryonen verstarben vor Erreichen des Stadiums 40. Die Anzahl verschiedener Weibchen pro Befruchtungszeitpunkt war in (A) 4 bei 0 h; 2 bei 3 h und 3 bei 5,2 h; in (B) 7 bei 0 h; je 3 bei 3,3; 3,8 und 6,3 h und 2 bei 5,4 h. Es ist die Standardabweichung angegeben. Für den nicht gepaarten Student t-Test wurden die mit Klammern umschlossenen Gruppenwerte zusammengefasst und mit frisch befruchteten Eiern verglichen (* und ** entsprechen p-Werten von 0,05 bzw. 0,01). (C) Stadium 40 Larven aus in MBS gealterten Eiern zeigen eine Vielfalt an Fehlbildungen. Abgebildete Larven stammen aus verschiedenen Versuchen: Ödeme (öd), abnorme Darmentwicklung (ad), gestauchter (gk) oder fehlender Kopf (fk), Zyklon (zy) und verkleinerte Augen (va), Rücken oder Schwanzkrümmung (sk) sowie multiple Fehlbildungen (m). Normalentwickelte Larve ist durch Pfeil angezeigt. (D) Zusätzliche Larven aus in MBS gealterten Eiern ohne Fehlbildungen zeigten eine verkleinerte Körperlänge und waren in Entwicklung retardiert. Normalentwickelte Larve gleichen Alters im Vergleich durch Pfeil angezeigt. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Für weitergehende Versuche wählte ich eine Alterung von 3 h, da bei diesem Zeitpunkt die Befruchtungsfähigkeit kaum verändert, die Überlebensrate hoch genug ist, um eine Mindestzahl an Stadium 40 Larven für die Auswertung zu garantieren, und die Fehlbildungsrate bereits drastisch zunimmt.

3.2 Einfluss der Eialterung auf die DNA Methylierung einzelner Gene

In *Xenopus tropicalis* lagen zum Zeitpunkt der Dissertation Daten zur DNA Methylierung einzelner Gene nicht vor. In der nah verwandten Art *X. laevis* waren jedoch DNA Methylierungsmuster der Gene *c-Myc*, *cardiac Actin* und *Xbra* während der frühen Embryonalentwicklung beschrieben worden (Stancheva *et al.*, 2002). Ausgehend von diesen Analysen wollte ich testen, ob die postovulatorische Eialterung einen Einfluss auf die Stabilität epigenetischer DNA Muster dieser 3 Gene besitzt.

3.2.1 Optimierung der DNA Isolierung aus frühen Embryonen

Eine der häufigsten Methoden zur Analyse der DNA Methylierung einzelner Gene ist über die Bisulfitbehandlung der DNA. Dabei werden alle unmethylierten Cytosine durch Desaminierung in Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine nicht mit Bisulfit reagieren und daher als Cytosine verbleiben. Daher kann durch direkte Sequenzierung von PCR Produkten aus bisulfitbehandelter DNA der Methylierungsstatus abgeleitet werden. Da die in frühen *Xenopus* Embryonen reichlich vorhandenen Lipide, Pigmente sowie RNA die vollständige Bisulfitkonvertierung bzw. nachfolgende Schritte der Methylierungsanalyse beeinträchtigen könnten, war darauf zu achten, eine möglichst saubere genomische DNA zu isolieren. Hierzu habe ich 20 Blastula (Stadium 8 - 9) lysiert und mit RNase A verdaut. Die gewonnene genomische DNA extrahierte ich mittels Phenol/Chloroform und reinigte sie über eine Ammoniumsulfat/Isopropanolfällung. Eine spektroskopische Konzentrationsbestimmung dieser DNA ergab eine Ausbeute von 600 ng pro Blastula. Bei einer Annahme, dass eine späte Blastula ca. 10^5 Zellen besitzt, dürfte bei 3 pg DNA pro Kern jedoch eine maximale Ausbeute von ca. 30 ng pro Embryo zu erwarten sein, d.h. Faktor 20 weniger. Um den Reinheitsgrad der isolierten DNA zu überprüfen, trennte ich die DNA in Äquivalenten von 500 ng, 100 ng und 30 ng gemessener Nukleinsäure mittels Agarose-Gelelektrophorese auf. Um den tatsächlichen Anteil an genomischer DNA abschätzen zu können, trug ich parallel 200 ng, 100 ng und 30 ng sauberer genomischer DNA, die ich zuvor aus *Xenopus tropicalis* Blutzellen ebenfalls über Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert habe, zum Vergleich mit auf. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, entsprach ein Großteil der

aus Blastula isolierter DNA Nukleinsäurefragmente von ca. 0,3 - 0,8 kb. Die Stärke der Bande bei > 7 kb, die der genomischen DNA entspricht, war dagegen in Spur 1 (500 ng Blastula DNA) etwa der in Spur 6 (30 ng Blut DNA) vergleichbar. Somit dürften nur ca. 6 % der isolierten Nukleinsäure genomischer DNA entsprechen. Dementsprechend beliefe sich die Ausbeute pro Blastula auf ca. 36 ng pro Embryo, was mit der erwarteten DNA Menge einer Blastula in etwa übereinstimmt. Ich vermutete, dass ein Großteil der kontaminierenden kurzen Nukleinsäurefragmente RNA entspricht. Daher wiederholte ich die Phenol/Chloroform-Extraktion mit einem zusätzlichen RNase A Verdau Schritt sowie einer 10 fachen Menge des Enzyms. Die Reinheit der DNA konnte hierdurch jedoch nicht wesentlich verbessert werden (Abb. 3B, Spur 1).

Da die über Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnene DNA hauptsächlich aus nicht genomischer DNA bestand, gewann ich in einem zweiten Ansatz DNA aus 5 Blastula über das PqGOLD Microspin Tissue DNA Kit. Dabei wird genomische DNA auf einer Silikatsäule gebunden mit RNase A verdaut. Hier betrug die Ausbeute 24 ng pro Embryo. Die DNA Analyse auf dem Gel zeigte im Gegensatz zur Phenol-Chloroform-extrahierten DNA keine Nukleinsäurefragmente außerhalb der genomischen DNA (Abb. 3B, Spur 2).

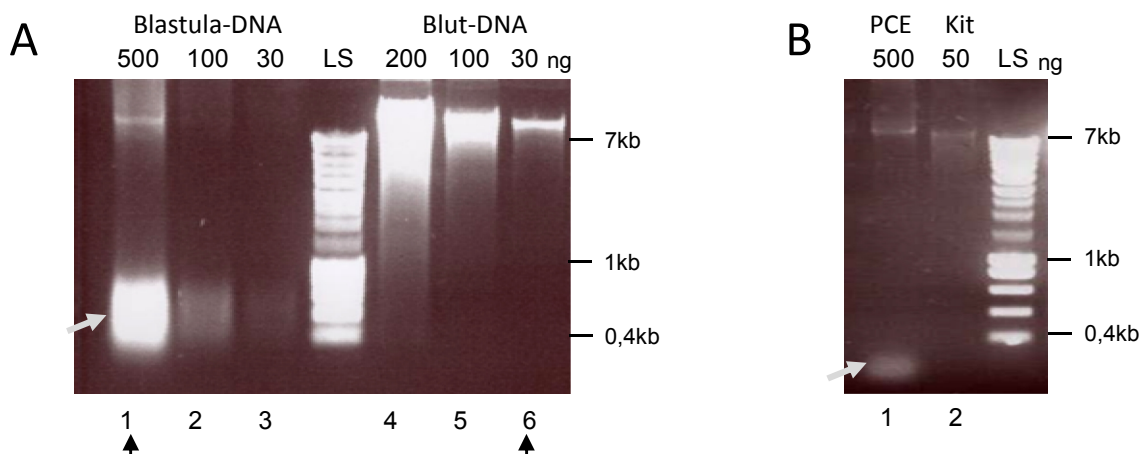


Abb. 3: Qualitätsunterschiede in der Präparation genomischer DNA.

(A) Mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isolierte DNA aus Blastula (Spur 1 - 3) und Blutzellen (Spur 4 - 6) wurde in 3 Mengenäquivalenten auf 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt. Kontaminierende Nukleinsäurefragmente sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. LS entspricht dem Längenstandard (Marker). (B) Vergleich von 500 ng Phenol/Chloroform extrahierter DNA (PCE) mit 50 ng über PqGOLD Microspin Tissue DNA Kit isolierter DNA (Kit) aus Blastula. Der Pfeil zeigt verunreinigende Nukleinsäurefragmente an. LS gibt den Längenstandard an.

Auf diesem Ergebnis basierend präparierte ich die genomische DNA für weitere Analysen aus je 5 Embryonen mittel des PqGOLD Microspin Tissue DNA Kit.

3.2.2 Methylierungsmuster von *Xbra*, *cardiac Actin* und *c-Myc*

In *X. laevis* wurde berichtet, dass zwischen dem Stadium der Blastula und der Gastrula Änderungen in der CpG Methylierung in Promotor- aber nicht innerhalb der Genregionen von *Xbra*, *cardiac Actin* und *c-Myc* erfolgen. Daher sollten in *X. tropicalis* ebenfalls die Promotorregionen dieser 3 Gene analysiert werden. Im Gegensatz zur Protein kodierenden Region sind Promotorregionen zwischen *X. laevis* und *X. tropicalis* jedoch nicht stark konserviert. Primer wurden so gewählt, um bei einer Produktgröße von maximal 500 bp möglichst nah am Promotor eine hohe Anzahl an CpG zu untersuchen. Die zu amplifizierenden Genabschnitte sind in Abb. 4 als grüne Balken verzeichnet.

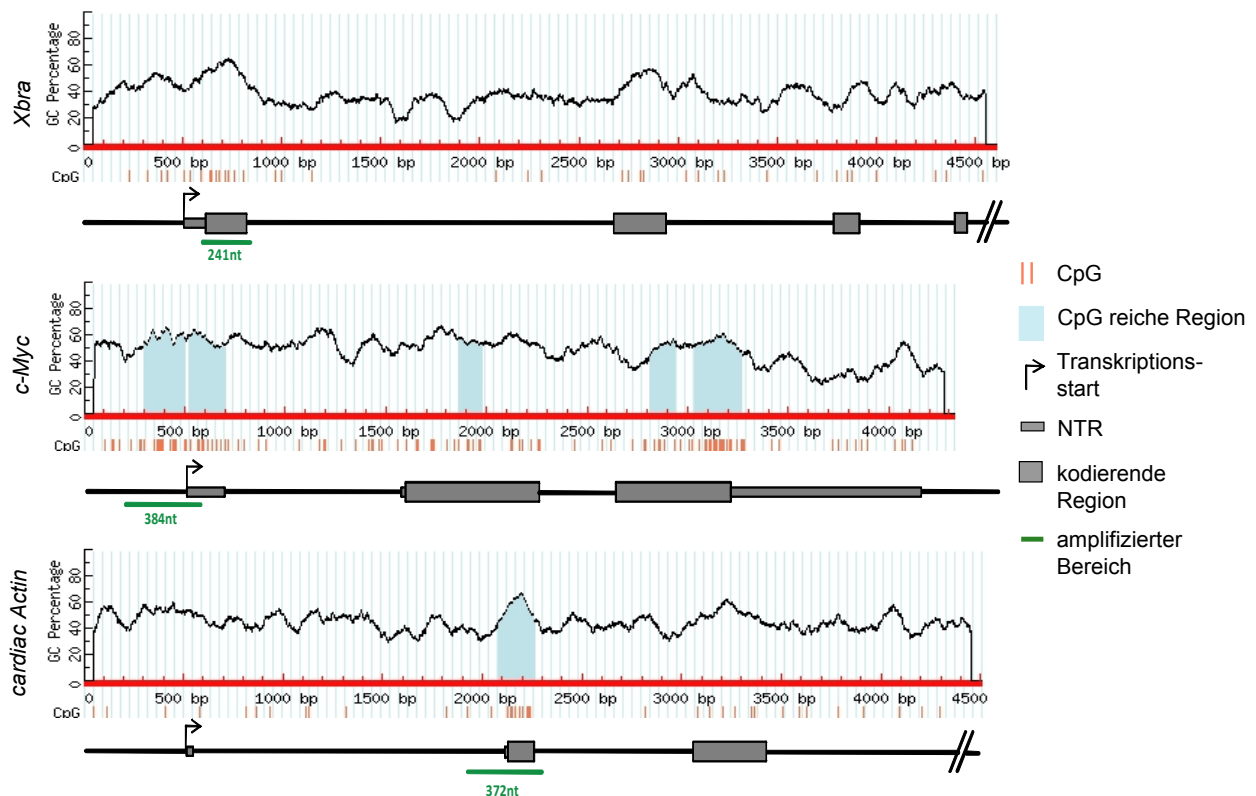


Abb. 4: Schematische Darstellung der Gene *c-Myc*, *Xbra* und *cardiac Actin* in *X. tropicalis*.

Dargestellt ist für jedes Gen die Region -500 nt bis ca.+4500 nt vom jeweiligen Transkriptionsstart (Pfeil). Die Frequenz der CpG (rote vertikale Striche) sowie CpG reiche Regionen (blau) wurden mittels des MethPrimer Programms ermittelt. Als eine CpG reiche Region definierte ich eine mindestens 100 bp lange Genomregion mit einem CG-Gehalt von über 50 % und einem Quotient der beobachteten CG-Dinukleotide im Vergleich zu erwarteten CG-Dinukleotiden von 0,6. Nicht-translatierte Exons sind durch dünne graue Balken (NTR), kodierende Bereiche durch dicke graue Balken angegeben. Für *c-Myc* ist die gesamte Genregion abgebildet, für *Xbra* und *cardiac Actin* nur partiell. Der für die Methylierungsanalyse zu amplifizierende Bereich (grün) liegt jeweils in CpG dichtesten Abschnitten.

Für *Xbra* wurde ein 241 bp langer hauptsächlich proteinkodierender Bereich in der Nähe des Translationsstarts +114 bis +354 mit 9 CpG gewählt, für *c-Myc* ein 384 bp langer Promotorbereich –319 bis +65 mit 18 CpG. Für *cardiac Actin* wählte ich einen Bereich von 372 bp um das 2. Exon +1400 bis +1771 mit 12 CpG, da im promotornahen Bereich CpG selten waren.

Um zu analysieren, ob die postovulatorische Eialterung Änderungen im Methylierungsmuster bewirkt, sammelte ich aus frischen sowie gealterten Eiern der gleichen Eiablage 3,8 bis 5 h nach Besamung (hpi) je 5 Blastula (Stadium 7 - 8) sowie 8,5 bis 13 hpi je 5 Gastrula (Stadium 10,5 - 12) und isolierte die genomische DNA. Nach Bisulfitbehandlung der DNA amplifizierte ich diese in der PCR. Primer habe ich so erstellt, dass sie keine CpG enthalten und nur an bisulfitkonvertierte DNA binden können (Tab. 1). Die PCR-Produkte sequenzierte ich direkt. Den Methylierungsstatus der jeweiligen CpG leitete ich durch einen Vergleich des Sequenzierungsergebnisses mit der genomischen PCR-Produktsequenz ab. Dabei waren alle untersuchten CpG entweder vollständig methyliert oder vollständig demethyliert. Mischformen, die in einem CpG sowohl ein Thymin- als auch ein Cytosinsignal aufwiesen, lagen nicht vor. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, gab es keine Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Weibchen (Exp. 1 - 4). Die untersuchte Region von *Xbra* sowie von *c-Myc* war in allen Blastula und Gastrula demethyliert, die analysierte Region von *cardiac Actin* dagegen methyliert. In allen 3 Genen konnte ich folglich keine Veränderungen des Methylierungsmusters zwischen den einzelnen Embryonalstadien sowie keine Veränderungen zwischen frischen und gealterten Eiern beobachten.

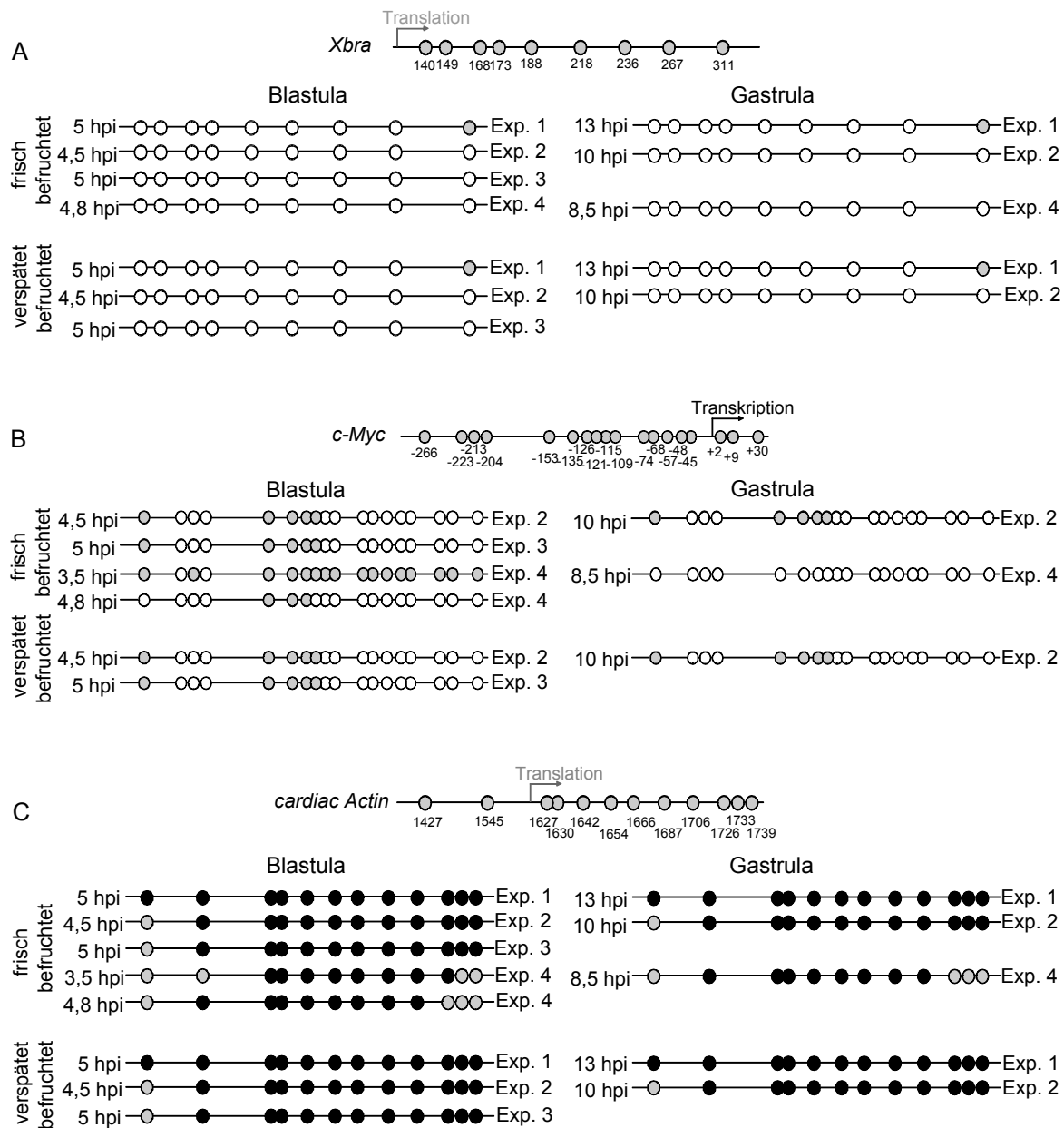


Abb. 5: DNA Methylierung von *Xbra*, *c-Myc* und *cardiac Actin* in Embryonen aus frischen und gealterten Eiern.

Jeweils oben: CpG Karte einer **(A)** 241 bp langen Region von *Xbra* am Beginn der translatierten Region (grauer Pfeil), **(B)** einer 376 bp langen Region von *c-Myc* am Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil). bzw. **(C)** einer 371 bp langen Region am Translationsstart (grauer Pfeil) von *cardiac Actin*. CpG sind durch Kreise markiert, die zugehörigen Nummern geben die Entfernung zum Transkriptionsstart an. Jeweils unten: Ergebnis der Bisulfitsequenzierung. Methylierte CpG sind durch schwarze, unmethylierte durch weiße Kreise wiedergegeben. CpG, die aufgrund schlechter Sequenzqualität nicht eindeutig ablesbar waren, sind durch graue Kreise wiedergegeben. Experiment 1 - 4 entspricht 4 verschiedenen Weibchen. Methylierungsergebnisse konnten in unabhängigen Analysen von Embryonen des gleichen Weibchens (Exp.), gleicher Alterung (frisch oder gealtert) und gleicher Entwicklung (hpi) vollständig reproduziert werden und sind hier nicht angezeigt.

3.3 Analyse maternalen mRNA

In diesem Teil der Arbeit sollten mögliche Änderungen der maternalen mRNA während der Eialterung aufgespürt und beleuchtet werden. Hierzu war die Menge polyadenylierter mRNA zwischen frischen und gealterten Eiern mittels qRT-PCR sowie Microarray zu analysieren. Der für *X. tropicalis* erhältliche Genchip von Affymetrix beinhaltet 58.000 SONDENSÄTZE, die 51.000 Transkripte repräsentieren. Für Oligo(dT) basierte Microarray sowie qRT-PCR Analysen ist eine hohe RNA Integrität essentiell. Eventuelle mRNA Strangbrüche würden nämlich bei einer reversen Transkription der mRNA zu einem vorzeitigen Abbruch der cDNA Synthese führen. Dies würde zuverlässige Quantifizierung von polyadenylierten Transkripten verhindern. Es sollten daher zunächst Bedingungen untersucht werden, unter denen eine bestmögliche RNA Qualität gewährleistet ist.

3.3.1 Optimierung von RNA Isolierung und Qualitätsanalyse

Ich untersuchte zunächst inwieweit die Inkubation der Eizellen in RNAlater, einem RNA stabilisierenden Reagenz, bzw. die direkte Einfrierung der Eier auf Trockeneis im Vergleich die RNA Qualität beeinflussen. Zweitens verglich ich die RNA Isolierung über PeqGOLD RNA pure, einem Trizolreagenz, mit der über PeqGOLD RNA Total Isolierungskit. Beim ersten Protokoll handelt es sich um die klassische RNA Trizol/Chloroform-Extraktion, mit einer anschließenden Alkohol-Fällung und Waschung der pelletierten RNA. Beim zweiten Protokoll wird dagegen die RNA auf einem Silikat-Säulenmaterial gebunden, dort gewaschen sowie zusätzlich mit DNase verdaut. Hierzu arbeitete ich je 10 Eizellen der gleichen Eiablage unter den 4 verschiedenen Bedingungen auf (Tab. 5) und beurteilte die RNA Ausbeute sowie die RNA Qualität anhand des Extinktionsquotientes. Zusätzlich verglich ich den Gehalt von mRNA über die Referenz-mRNA *odc* in der qRT-PCR.

Trizol-extrahierte RNA zeigte im Vergleich zur säulenaufgearbeiteten RNA in der spektroskopischen Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung zwar eine im Schnitt doppelt so hohe Ausbeute, in einer anschließenden qRT-PCR Bestimmung von *odc* jedoch einen um 10 Zyklen höheren Ct-Wert. Letzteres zeigt, dass die Konzentrationsbestimmung trizolisolierter RNA nicht zuverlässig ist, was für quantitative Vergleichsanalysen jedoch nicht unbedeutend ist. Vermutlich ist die trizol-extrahierte RNA mit Trizol verunreinigt, welches ebenfalls bei 260 nm absorbiert.

Eine DNA Kontamination konnte ich anhand negativer -RT Kontrollen in beiden RNA Isolierungsmethoden ausschließen. Ob die Eier vor der Isolierung in RNAlater aufbewahrt oder direkt auf Trockeneis gefroren wurden, zeigte in der qRT-PCR nur geringe Unterschiede. Da die RNA Ausbeute ohne RNAlater Zusatz jedoch um 67 % höher lag sowie der Extinktionsquotient besser war, fror ich Eizellen für spätere Analysen nur noch direkt auf Trockeneis ein und gewann die RNA mittels dem PeqGOLD RNA Total Isolierungskit.

Tab. 5: Optimierung der RNA Isolierung zur Analyse der Menge polyadenylierter Transkripte.

Es wurden aus jeweils 10 unbefruchteten Eiern gleicher Eiablage RNA nach 4 verschiedenen Protokollen isoliert. Hierzu wurden die Eier 5 s bei 5000 rpm im Precellys Homogenisator aufgeschlossen. RNA Ausbeute, Reinheitsgrad und Effizienz der qRT-PCR für das Referenzgen *odc* wurden verglichen. Mittels Trizolreagenz aufgereinigte RNA aus in RNAlater inkubierten Eiern zeigte Verunreinigung durch Pigmente und wurde nicht weiter in der qRT-PCR analysiert (n.a).

RNA Isolierung Methode	Eizellen-aufbewahrung	Ausbeute pro Ei in ng	Extinktions-quotient A _{260/280}	qRT-PCR <i>odc</i> Ct	StAbw
PeqGOLD RNA pure (Trizolreagenz)	RNAlater	443	2,03	n.a	n.a
	Trockeneis	727	1,71	34,2	0,4
PeqGOLD Total RNA Isolation Kit	RNAlater	289	2,14	24,7	0,1
	Trockeneis	483	1,96	22,8	0,0

Weiterhin galt es den Einfluß der Homogenisierungsdauer auf die RNA zu bestimmen. Dazu wählte ich im Precellys Homogenisator die niedrigste Umdrehungszahl von 5000 rpm und schloss Eier gleicher Eiablage unterschiedlich lange auf. Ich stellte fest, dass mit zunehmender Homogenisierungsdauer weniger RNA erzielt werden konnte (Abb. 6A). Ähnlich wie in Tab. 5 konnte ich auch in diesem Versuch aus in RNAlater inkubierten Eiern weniger RNA gewinnen. Die Ausbeute in frischen sowie gealterten Eiern war dagegen gleich (Abb. 6A). Die geringe Standardabweichung in der RNA Ausbeute in frischen sowie gealterten Eiern aus ein und demselben Weibchen gibt keine Hinweise darauf, dass die Eialterung einen Einfluss auf die RNA Ausbeute hat (Abb. 6A und B). Im Gegensatz hierzu unterschieden sich die RNA Ausbeuten zwischen einzelnen Weibchen beträchtlich (Abb. 6B).

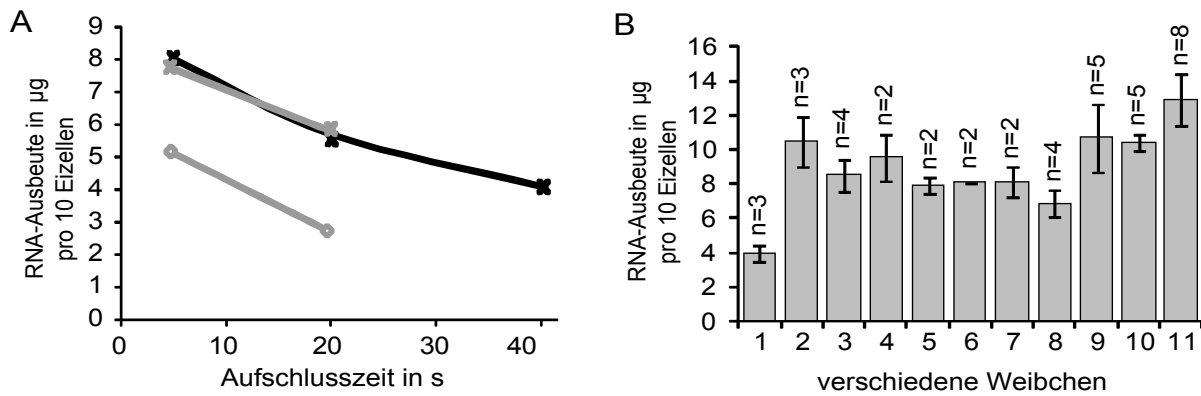


Abb. 6: RNA Ausbeute beeinflussende Faktoren.

(A) Abnahme der RNA Ausbeute pro 10 Eier aus gleicher Eiablageung mit zunehmender Homogenisierungsdauer. Frische (schwarz) sowie 3 h gealterte (grau) Eier wurden in Trockeneis eingefroren (Kreuz) bzw. in RNAlater (Rechteck) inkubiert und ihre RNA mittels PeqGOLD Total RNA Isolierungskit gewonnen. Tab. 5 und Abb. 6A stammen von verschiedenen Weibchen. (B) Durchschnittliche RNA Ausbeuten in verschiedenen Weibchen aus frischen und gealterten Eiern. 1 - 2 entsprechen in RNAlater inkubierten, 3 - 11 in Trockeneis gefrorenen Eizellen, deren RNA nach 5 s Homogenisation mittels RNA PeqGOLD Total RNA Isolierungskit gewonnen wurde. Es ist die Standardabweichung sowie Anzahl der pro Eiablageung unabhängigen Präparate angegeben.

Bisher verglich ich die Qualität der RNA zwischen verschiedenen Protokollen anhand des Extinktionsquotienten und der relativen Menge von *odc* in der qRT-PCR. Um eine Integrität der RNA zu bestätigen, trennte ich totale RNA mittels Kapillarelektrophorese auf einem Agilent Chip auf. Da die mRNA einer Zelle nur etwa 1 % der totalen RNA entspricht, ist diese kaum darzustellen. Allerdings kann von der Integrität der ribosomalen RNA, die ca. 80 % der totalen RNA ausmacht, auf die Integrität der mRNA rückgeschlossen werden. Abb. 7 zeigt, dass die rRNA sowohl in frischen als auch gealterten befruchtbaren Eiern intakt war. Die im Gegensatz zur humanen Kontroll-RNA beobachtete 28S Doppelbande könnte froschspezifisch sein. Es ist beim Frosch nicht unüblich, dass sich Eier nicht befruchten lassen, obwohl sie morphologisch unauffällig und frisch besamt sind. Interessanterweise zeigten diese unbefruchteten Eier veränderte 28S sowie 18S Banden. Einen signifikanten Einfluss der Homogenisierungsdauer auf die Integrität der ribosomalen RNA konnte ich nicht beobachten.

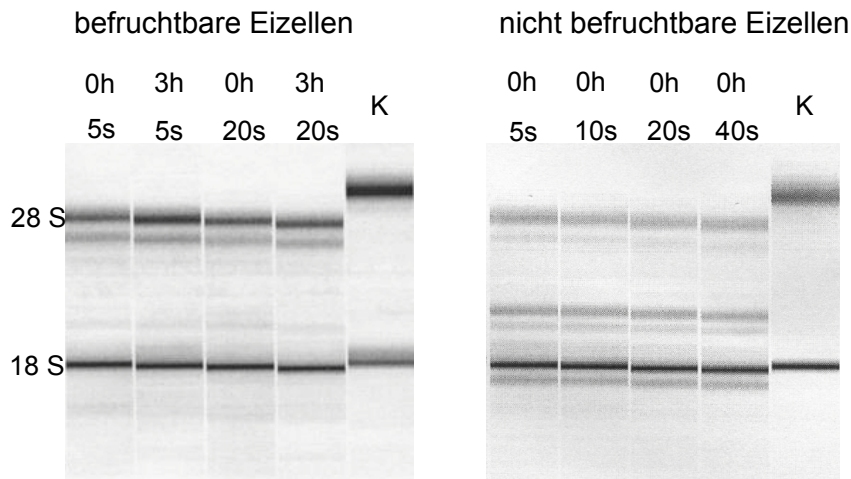


Abb. 7: Vergleich der Qualität totaler RNA aus frischen sowie gealterten bzw. befruchtbaren und nicht befruchtbaren Eizellen.

Es wurden frische (0h) sowie gealterte (3h) befruchtbare bzw. frische unbefruchtbare Eier zweier verschiedenener Weibchen in Trockeneis gefroren und ihre totale RNA mittels RNA PeqGOLD Total RNA Isolierungskit gewonnen. Diese wurde mittels Kapillarelektrophorese auf dem Agilent Chip aufgetrennt. Als Kontrolle (K) wurde kommerzielle RNA aus HeLa Zellen verwendet. Es ist je die ribosomale 18S Bande sowie die 28S als Doppelbande zu sehen. Letztere ist in nicht befruchtbaren Eiern von deutlich kleinerer Laufgröße als in befruchtbaren Eiern und äußert sich in einer neuen Bande zwischen 28S und 18S. Ein Einfluss der Homogenisierungsdauer (5 s - 20 s) auf die Verteilung der totalen RNA ist nicht erkennbar.

Eine direktere Schlussfolgerung auf die Integrität der polyadenylierten mRNA liefert die Verteilung der cRNA. Hierzu wurde totale RNA mittels eines T7-Promoter enthaltenden Oligo(dT) in cDNA umgeschrieben, *in vitro* mit T7-Polymerase in cRNA amplifiziert und auf einem Qiaxcel Chip aufgetrennt. Sowohl frische als auch gealterte Eier zeigten eine der Kontrolle vergleichbare gleichmäßige Verteilung der cRNA, wobei der Hauptanteil der cRNA Fragmente zwischen 100 – 600 nt lag (Abb. 8). Die cRNA aus nicht befruchtbaren Eiern dagegen wies nur kleine Fragmente auf. Es scheint, dass nicht befruchtungsfähige Eier weniger intakte mRNA besitzen. Da die cRNA aus frischen sowie gealterten, befruchtbaren Eiern von gleich hoher Qualität war, wurde sie für die folgende Microarray Analyse verwendet.

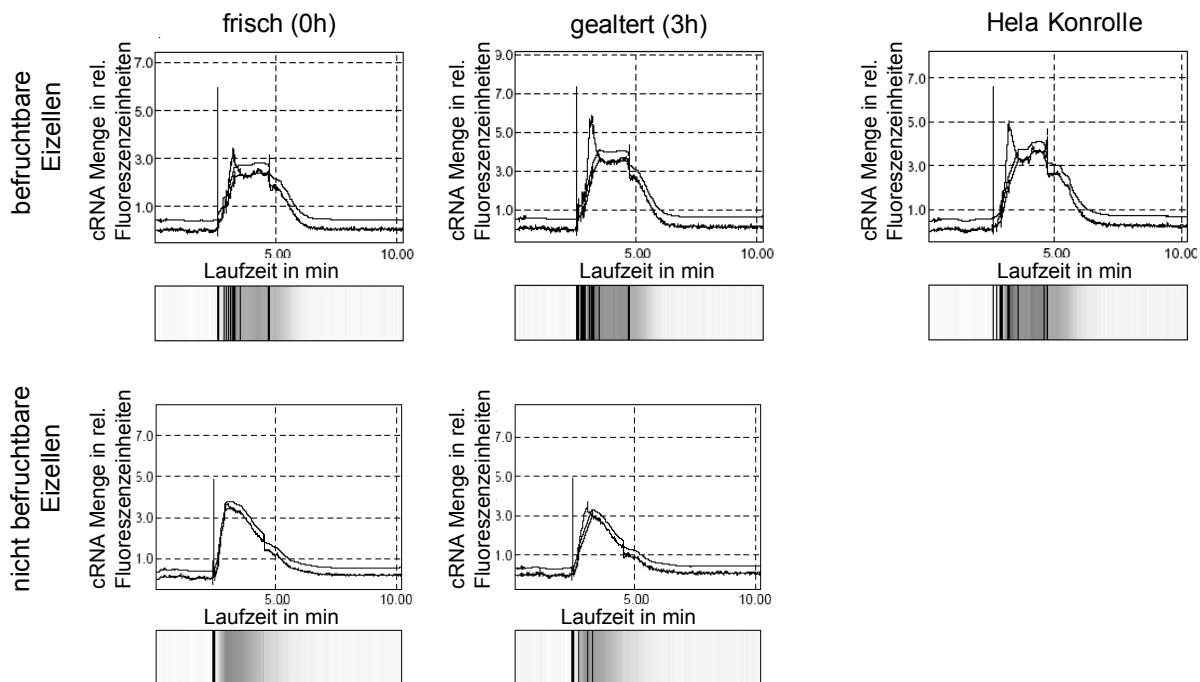


Abb. 8: Vergleich der cRNA Qualität aus frischen sowie gealterten Eizellen.

Verteilung von cRNA mittels Kapillarelektrophorese auf Qiaxcel Chip hergestellt über Oligo(dT) vermittelte reverse Transkription und anschließender *in vitro* Transkription. Für die cRNA Synthese wurde die totale RNA aus 5 s lang homogenisierten befruchtbar bzw. nicht befruchtbar Eiern verwendet, der gleichen, wie in Abb. 7 analysiert. Als Kontrolle wurde kommerzielle RNA aus HeLa Zellen verwendet.

3.3.2 Microarray Analyse polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern

Es war ein möglicher Einfluss der Eialterung auf den Vorrat maternaler Transkripte zu beleuchten. Hierzu sollte das Transkriptom von frischen und gealterten Eizellen verglichen werden. Die für die Microarray Analyse verwendete RNA entsprach einem Experiment, in dem die Überlebensrate von Larven aus 3 h verspätet befruchteten Eiern nur wenig abnahm, die Fehlentwicklungsrate jedoch 2,5 fach bzw. die Rate an unterentwickelten Larven mit eingerechnet um 4,2 fach anstieg (Abb. 9A). Um eventuelle Varianzen zwischen den einzelnen Stichproben innerhalb einer Eiablage zu berücksichtigen wurden 2 Stichproben aus je 10 frischen, unbefruchteten Eiern gegen 2 Stichproben aus je 10 gealterten, unbefruchteten Eiern miteinander verglichen. Abb. 9B zeigt die Signalstärken aller im Array gemessenen SONDENSÄTZE jeweils im Vergleich zweier Stichproben miteinander. Diese sind als Punkte dargestellt, deren Farbe zeigt, ob sie präsent, fehlend oder marginal detektiert wurden. Punkte, die auf der mittleren Diagonalen liegen, entsprechen SONDENSÄTZEN,

die in beiden Stichproben ähnliche Signalstärken besitzen. Sondensätze, deren Signalstärke zwischen den Stichproben verändert ist, weichen von dieser ab. Der Grad der Signalstärkenänderung wird über die zur mittleren Diagonalen parallelen Linien angedeutet, die eine 2, 3, 5 bzw. 10 fache Änderung der Signalstärke darstellen.

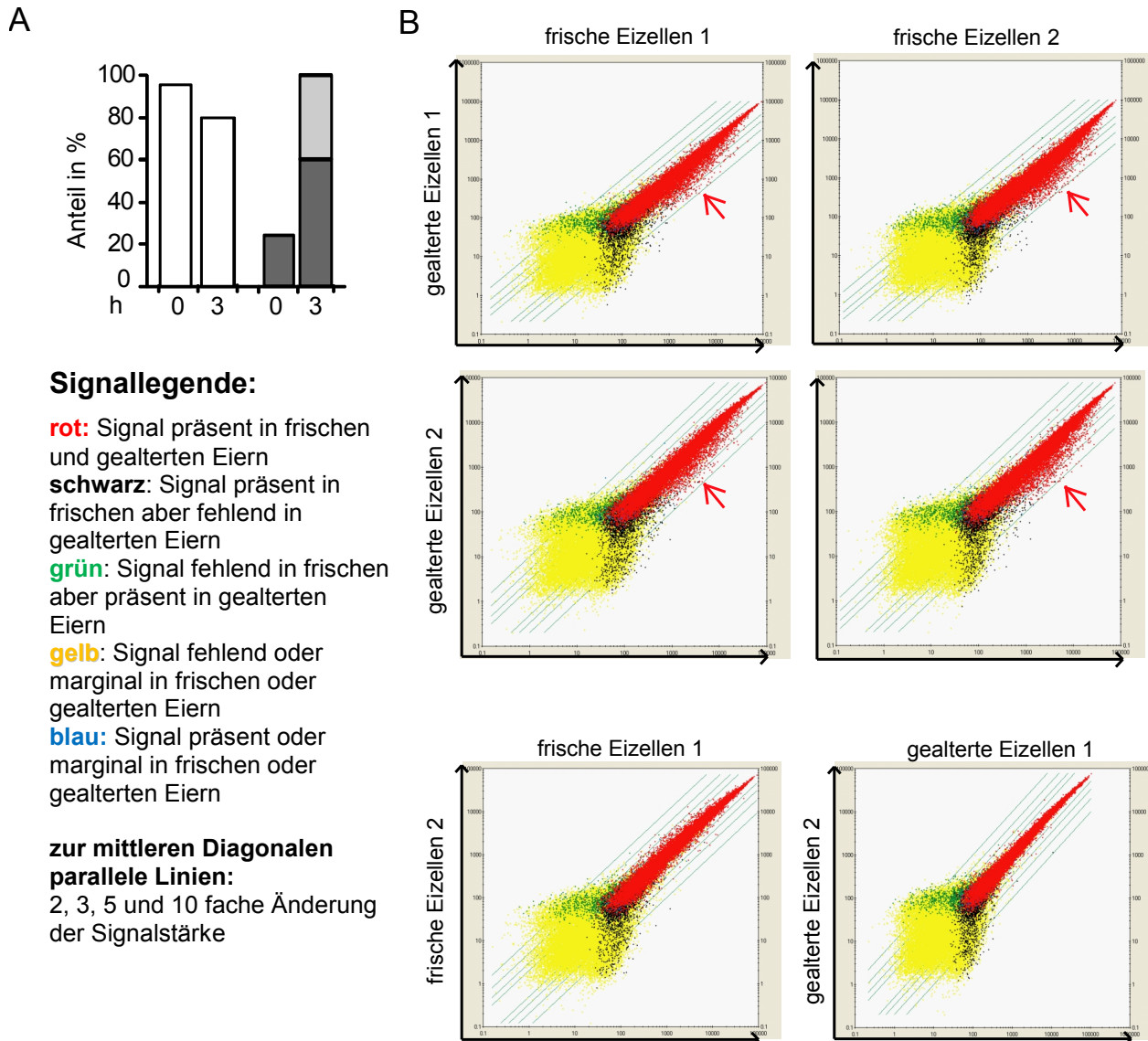


Abb. 9: Veränderungen des Transkriptomes in Eiern mit während der Alterung gemindertem Entwicklungspotenzial.

(A) Das Entwicklungspotenzial von zur Microarray Analyse verwendeten frischen (0) bzw. 3 h gealterten Eiern (3) ist aufgezeigt anhand der Überlebensrate (weiße Balken) und dem Anteil an fehlgebildeten (dunkelgraue Balken) sowie unterentwickelten Larven (hellgraue Balken) im Stadium 40. (B) Vergleiche von 4 Microarray untereinander. Aufgezeigt sind alle im Array gemessenen Sondensätze sowie deren Signalstärke in logarithmischer Skalierung (schwarzer Pfeil) in jeweils 2 miteinander zu vergleichenden Stichproben. Die Änderung der Signalstärke ergibt sich aus der Abweichung von der mittleren Diagonale. Roter Pfeil zeigt eine große Anzahl an Sondensätzen, die in frischen Eiern eine wesentlich höhere Signalstärke besitzen als in gealterten. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Alle Vergleiche frischer gegen gealterte Eier zeigen sehr viele Sondensätze auf, die in beiden Stichproben präsent sind (rote Punkte), in frischen Eiern aber eine viel höhere Signalstärke besitzen (Abb. 9, roter Pfeil). Dagegen finden sich kaum Sondensätze, die in beiden Stichproben präsent sind und in gealterten Eiern eine deutlich höhere Signalstärke besitzen als in frischen. Dieses Muster ist in allen 4 Vergleichen frischer gegen gealterter Eier wiederzuerkennen jedoch nicht im Vergleich von frischen gegen frische bzw. gealtert gegen gealterte Eier.

Zur weiteren Analyse berücksichtigte ich ausschließlich Sondensätze, deren Signalintensität in allen 4 Quervergleichen in gealterten Eiern entweder als reduziert, nicht verändert oder verstärkt bestimmt wurde. Unter diesen Bedingungen wurden 1785 signalreduzierte Sondensätze, davon 897 mehr als 2 fach und 177 mehr als 4 fach reduzierte identifiziert. Dagegen zeigten nur 174 Sondensätze eine Signalzunahme, davon nur 9 mehr als 2 fach und keine mehr als 4 fach (Tab. 6). Die insgesamt 1959 verändert gemessenen Sondensätze entsprechen 15,3 % aller in 4 Vergleichen einheitlich gemessenen Sondensätze. Eine tabellarische Aufstellung der in gealterten Eiern ≥ 4 fach signalveränderten Sondensätze befindet sich im Anhang (Tab. A1). Die vollständigen Microarray Daten sind im NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) unter der Zugangsnummer GSE21109 abrufbar.

Tab. 6: Microarray Analyse polyadenylierter mRNA.

Verglichen wurden zwei Stichproben frischer Eier mit zwei Stichproben gealterter Eier miteinander.

Eigenschaft	Anzahl Sondensätze	Eigenschaft	Anzahl Sondensätze
ganzes Affymetrix Genome Array	58000	In gealterten Eiern signalverstärkt Σ	174
zuverlässig bestimmte Signaländerungen	3927 (gealtert-1 vgl. frisch-1) 5914 (gealtert-1 vgl. frisch-2) 3871 (gealtert-2 vgl. frisch-1) 4409 (gealtert-2 vgl. frisch-2)	< 2 fach	165
in allen 4 Vergleichen signalverändert	1959	≥ 2 fach	9
in allen 4 Vergleichen nicht signalverändert	10876	In gealterten Eiern signalreduziert Σ	1785
		< 2 fach	888
		≥ 2 fach	897
		≥ 4 fach	177
		≥ 8 fach	19

Um einen Einblick in die Funktion der jeweiligen Transkripte zu bekommen, untersuchte ich die signalreduzierten Transkripte mittels des Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit (GO EAST) (Zheng und Wang, 2008). Für mehr als 2 fach signalreduzierte Transkripte fand ich über 110 biologische Prozesse,

die mehr als 2 fach angereichert und eine Signifikanz $p < 0,01$ zeigten. Zu den am stärksten angereicherten GO gehörten hauptsächlich GO des Zellmetabolismus sowie Zellatmung. Eine detaillierte Auflistung ist im Anhang (Tab. A2) dargestellt.

Die im Mikroarray gefundenen Änderungen validierte ich mittels qRT-PCR, indem ich RNA aus der gleichen Isolierung, die für das Array benutzt wurde, ebenfalls mit Oligo(dT)₂₀ in cDNA transkribierte. Ich wählte 16 Transkripte aus, die verschiedenen biologischen Prozessen angehörten und deren SONDENSÄTZEN in der na30 Affymetrix Annotation ein Genname sowie eine Ref-Seq Transkript ID zugeordnet war (Tab. 2). Von diesen waren 14 mehr als 4 fach signalreduziert und 2 nicht signalverändert. Alle 14 im Array signalreduzierten Transkripte zeigten in der qRT-PCR ebenfalls eine Signalminderung, wobei diese mit der qRT-PCR Methode sogar stärker als im Array war (Abb. 10).

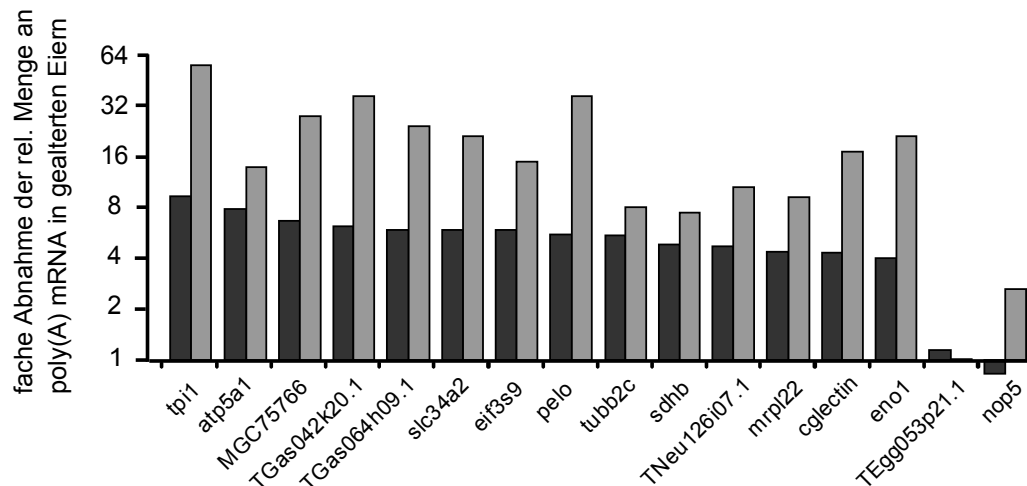


Abb. 10: Quantifizierung spezifischer polyadenylierter Transkripte während der Eialterung.

Die Signaländerung von 16 mRNA während einer 3 h Eialterung bestimmt im Mikroarray (schwarze Balken) wurde über Oligo(dT)₂₀ vermittelte qRT-PCR (graue Balken) validiert. Die ersten 14 Transkripte waren im Array mindestens 4 fach signalreduziert und spiegeln verschiedene biologische Prozesse wider (Tab. 2). Im Vergleich waren die Transkripte TEgg053p21.1 und nop5 im Array als nicht signalverändert bestimmt und dienten als Kontrolle. Die Transkriptbenennung folgt der na30 Affymetrix Annotation vom 23 November 2009. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

3.3.3 Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA korreliert mit Potenzialverlust in verschiedenen Weibchen

Um zu zeigen, dass die Änderungen in maternaler RNA nicht tierspezifisch sind, alterte ich Eier aus 7 verschiedenen Weibchen, wobei ein Weibchen in einem Abstand von 10 Monaten zweimal benutzt wurde. In allen 8 Experimenten konnte ich

einen Verlust der Eipotentialität durch Abnahme der Überlebensrate sowie einen Anstieg an fehl- bzw. unterentwickelten Larven beobachten (Abb. 11A). Obwohl die Eipotentialänderung zwischen einzelnen Weibchen stark variierte, zeigt dieser Versuch, dass ein Verlust der Eipotentialität durch verzögerte Befruchtung reproduzierbar ist. Gleichzeitig zeigte eine qRT-PCR Analyse mit den gleichen 14 signalreduzierten Transkripten wie in Abb. 10, dass in 7 von 8 Fällen eine Abnahme der Transkriptsignale vorlag (Abb. 11B). Somit korrelieren Eipotentialverlust und Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern miteinander. Eine Proportionalität zwischen der Stärke der Potenzialminderung und dem Grad der Signaländerung ist nicht gegeben.

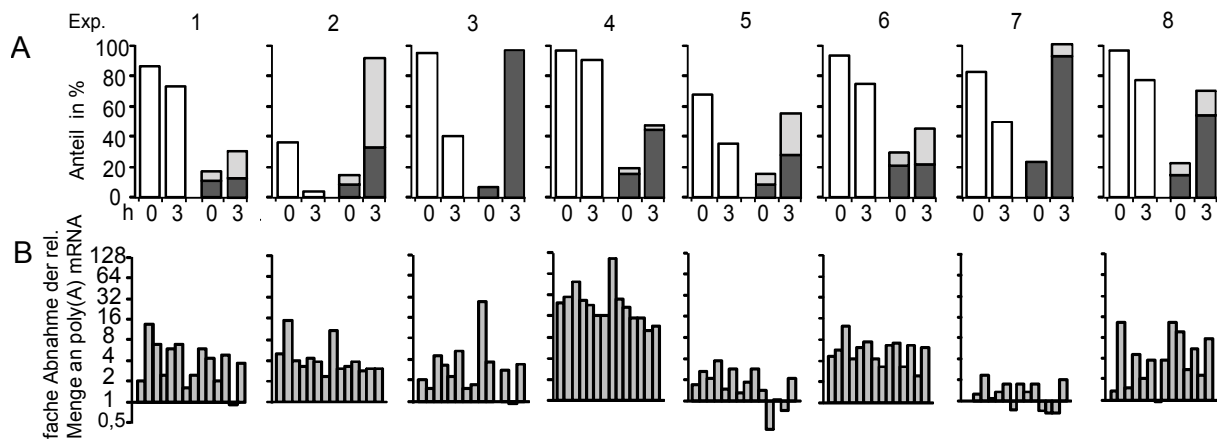


Abb. 11: Korrelation zwischen vermindertem Eipotenzial und reduzierter Menge polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern bei verschiedenen Weibchen.

(A) Anteil der im Stadium 40 überlebten (weiße Balken) fehlgebildeten (dunkelgraue Balken) sowie unterentwickelten (hellgraue Balken) Larven aus frischen (0) bzw. gealterten (3) Eiern in 8 unabhängigen Experimenten. Die anormale Entwicklung entsprach der in Abb. 2C und D. Eier im Experiment 6 stammen aus demselben Weibchen wie Experiment 2 und wurden 10 Monate später gewonnen. Das Experiment aus Abb. 9A ist hier nicht aufgeführt. (B) Von jedem Experiment wurde die Reduktion der relativen Menge an polyadenylierten Transkripten in gealterten Eiern mittels qRT-PCR bestimmt. Die Reihenfolge der 14 Transkripte entspricht der in Abb. 10. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

3.3.4 Korrelation zwischen Potenzialverlust und reduzierter Menge polyadenylierter Transkripte besteht unter verschiedenen Alterungsbedingungen

Die für die Microarray bzw. qRT-PCR Analyse verwendeten Eier alterten in MBS. Um zu bestätigen, dass die beobachtete Transkriptsignalreduzierung auf dem Alterungsprozess beruht und nicht aus der Inkubation in der Salzlösung an sich

resultiert, alterte ich Eier gleicher Ablage in MBS bzw. in feuchter Kammer und analysierte diese mittels qRT-PCR von je zwei verschiedenen Weibchen. Unter beiden Alterungsbedingungen konnte ich eine ähnliche Signalreduzierung beobachten, wodurch die Inkubation in MBS an sich als Ursache für die Signaländerungen der mRNA ausgeschlossen wurde (Abb. 12).

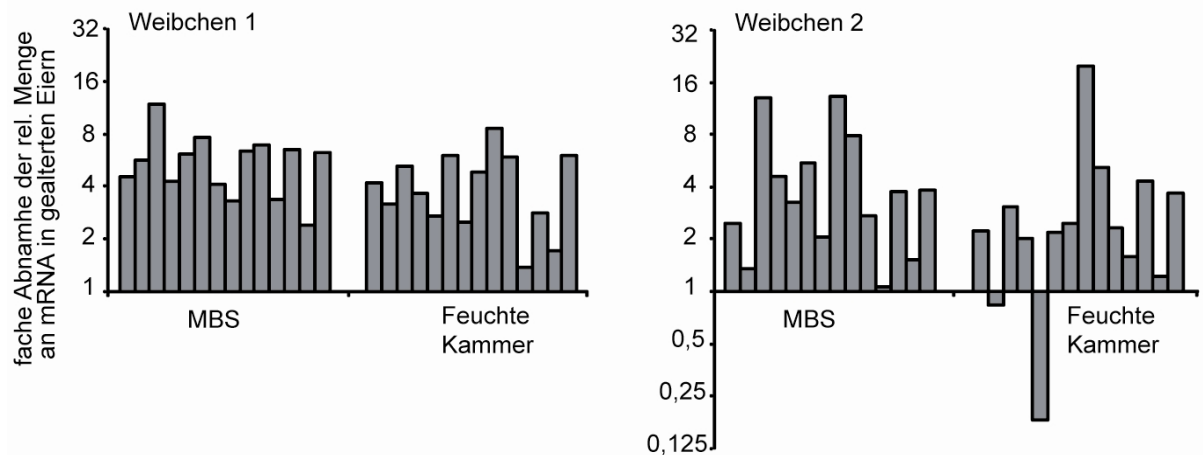


Abb. 12: Minderung der Transkriptsignale in in MBS bzw. feuchter Kammer gealterten Eiern im Vergleich.

Eier von zwei verschiedenen Weibchen wurden jeweils für 3 h in MBS bzw. feuchter Kammer gealtert und die Änderung der relativen Menge an polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern im Vergleich zu frischen mittels qRT-PCR bestimmt. Die Reihenfolge der 14 Transkripte entspricht der in Abb. 10. Weibchen 1 entspricht dem Experiment 6, Weibchen 2 dem Experiment 8 in Abb. 11. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Es war von Interesse zu sehen, ob der beobachtete Potenzialverlust durch verzögerte Befruchtung nicht nur *in vitro* sondern auch innerhalb eines Weibchens (*in vivo*) erfolgt. Hierzu entnahm ich einem Weibchen direkt nach der Ovulation, als die ersten Eier sichtbar wurden, einen Teil der Eier und alterte diese 3 h *in vitro*. Nach 90 min nahm ich vom gleichen Weibchen erneut Eier und besamte diese sofort. Die Eier aus der zweiten Eiablage hatten wie die *in vitro* gealterten Eier eine stark erhöhte Mortalitäts- sowie Fehlbildungsrate der Nachkommen (Abb. 13A). Dieses Experiment zeigt somit, dass auch eine *in vivo* Alterung zu einem Potenzialverlust führt. Eine Quantifizierung der polyadenylierten Transkripte ergab zudem, dass sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* gealterten Eier eine vergleichbare Reduzierung der relativen Transkriptmenge besaßen (Abb. 13B).

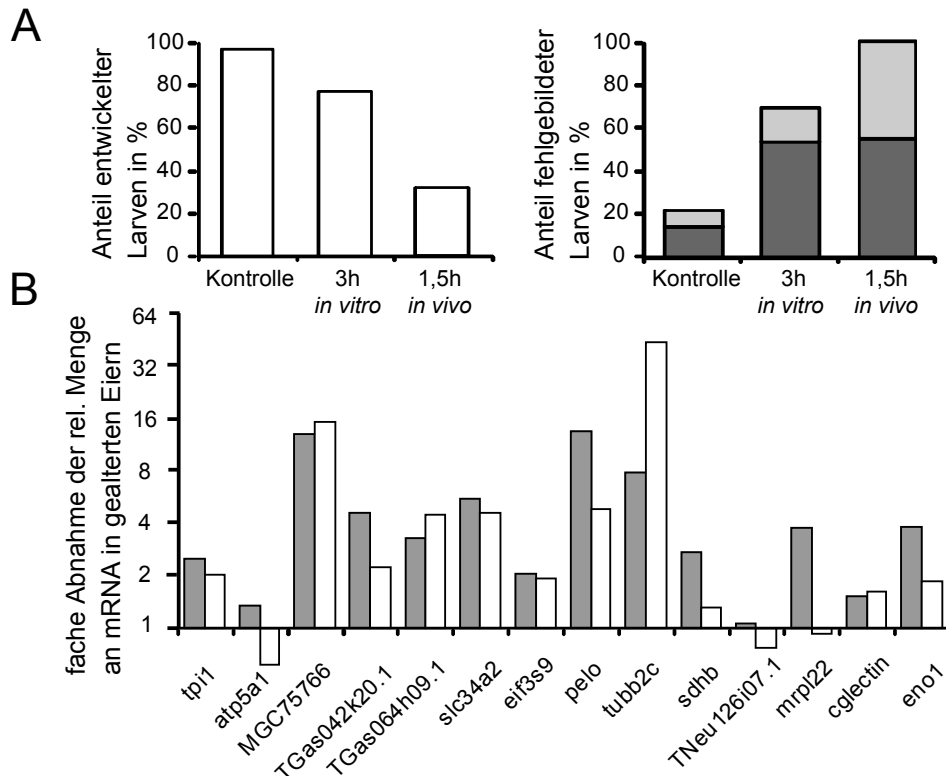


Abb. 13: Vergleich von *in vivo* und *in vitro* gealterten Eiern.

Eier der ersten Eiablageung eines Weibchens wurden 3 h in MBS gealtert (*in vitro*), Eier einer 90 min verspäteten Eiablageung (*in vivo*) dagegen sofort nach Eientnahme besamt. (A) Eine Verminderung des Entwicklungspotenzials wurde über die reduzierte Überlebensrate (weiße Balken) sowie erhöhte Fehlbildungsrate (dunkelgraue Balken) sowie Zunahme an unterentwickelten Larven (hellgraue Balken) im Stadium 40 aufgezeichnet. (B) Die mit qRT-PCR ermittelte Abnahme der Menge polyadenylierter Transkripte ist für *in vitro* (graue Balken) und *in vivo* (weiße Balken) gealterte Eier angezeigt. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

3.3.5 Transkripte werden deadenyliert statt degradiert

Durch die Verwendung von Oligo(dT)₂₀ zur reversen Transkription erfolgte sowohl im Array als auch in der qRT-PCR die Quantifizierung von ausschließlich polyadenylierter mRNA. Eine Signalminderung kann daher eine Deadenylierung der mRNA oder ein komplettes Verschwinden der mRNA durch Degradierung reflektieren. Bei Letzterer müsste bei einer mit *random* Hexanukleotiden getriebenen cDNA Synthese ebenfalls eine Signalminderung beobachtbar sein. Ich quantifizierte daher 14 Transkripte mittels qRT-PCR mit Oligo(dT)₂₀ und *random* Hexanukleotiden im Vergleich bei zwei verschiedenen Weibchen. Da in mit *random* Hexanukleotiden hergestellter cDNA keine Unterschiede zwischen frischen und gealterten Eiern vorlagen, wird die mRNA während der Alterung nicht abgebaut (Abb. 14).

Stattdessen liegt sie in der gealterten Eizelle zwar gleichhäufig vor, wird aber in ihrer PolyA-Länge soweit verkürzt, dass das Oligo(dT)₂₀ nicht mehr binden kann.

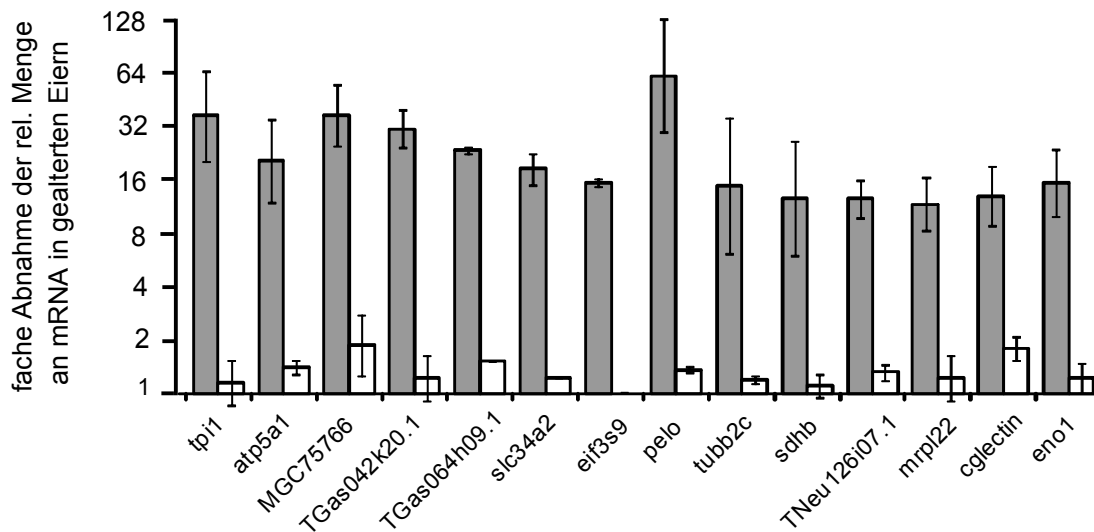


Abb. 14: Vergleich von Oligo(dT)₂₀ und *random* Hexanukleotid vermittelter qRT-PCR.

Reduzierung von 14 polyadenylierten mRNAs während einer 3 h Eialterung bestimmt mittels *random* Hexanukleotid (weiße Balken) und Oligo(dT)₂₀ vermittelter (graue Balken) qRT-PCR im Vergleich. Es ist die Standardabweichung von zwei verschiedenen Weibchen angegeben. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Um die postulierte PolyA-Verkürzung zu bestätigen, analysierte ich die PolyA-Längen von 4 während der Alterung signalverminderten sowie 5 nicht signalveränderten Transkripten mittels des RNA-Ligation-Polyadenylierung-Tests (RL-PAT). Hierbei wird an alle mRNA zunächst ein RNA Oligo (P1) ligiert und mit Hilfe eines zu ihm komplementären Primers (P'1) (Tab. 1) die ligierte mRNA revers transkribiert. Die anschließende PCR erfolgt mit einem genspezifischem sowie dem P'1 Primer, so dass die PCR-Produktgröße direkt von der eingeschlossenen PolyA-Länge abhängt (Abb. 15A). Eventuelle PolyA-Längenänderungen werden somit im Vergleich zwischen frischen und gealterten Eiern über die entsprechende Änderung der PCR-Produktgröße wiedergegeben. Für eine Bestimmung der PolyA-Länge wird die RNA vor der Ligation mit Oligo(dT)₂₀ und RNaseH vollständig deadenyliert, indem die RNaseH das RNA-DNA Hybrid aus PolyA und Oligo(dT) abspaltet. Durch Längenvergleich zwischen verdauter, d.h. PolyA-freier und nicht verdauter RNA kann die tatsächliche PolyA-Länge abgelesen werden.

Mittels dieses Assay konnte ich in Übereinstimmung zur qRT-PCR in allen 4 während der Alterung signalverminderten Transkripten eine PolyA-Verkürzung messen

(Abb. 15B). Alle 4 Transkripte besaßen einen relativ kurzen PolyA, der während der Alterung unter die benötigte Bindungslänge eines Oligo(dT)₂₀ reduziert wurde. Interessanterweise zeigte eine direkte Sequenzierung von *atp5a1* und *tpi1*, dass die Deadenylierung nicht nur den PolyA umfasste sondern auch zusätzliche Nukleotide der 3'NTR entfernt wurden. Dies erklärt, wieso die PCR-Produkte nicht verdauter RNA aus gealterten Eiern kleiner waren als die verdauter RNA aus frischen Eiern (Abb. 15B).

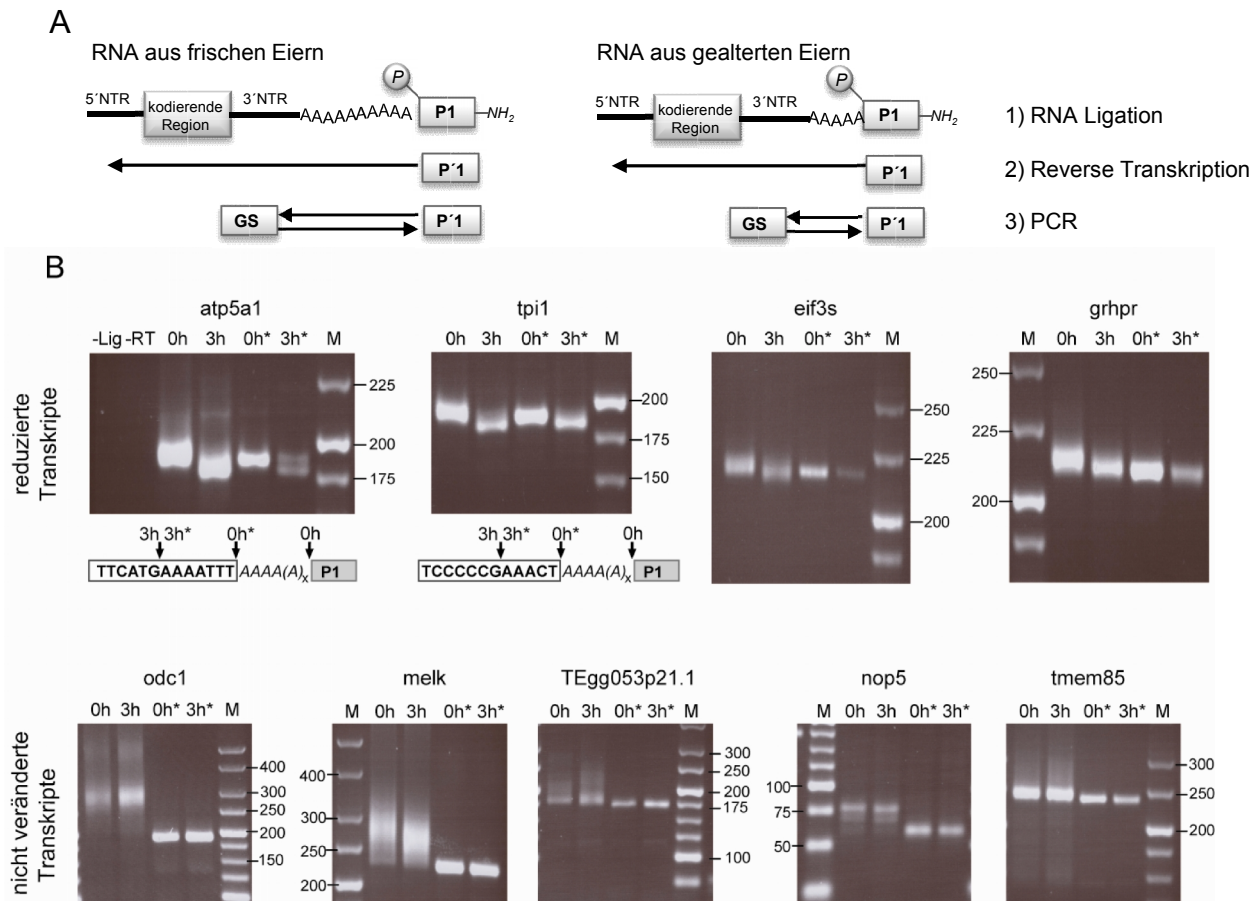


Abb. 15: PolyA-Längenänderung in spezifischen Transkripten während der Eialterung.

(A) Schematische Darstellung des RNA-Ligation-PolyA-Tests (RL-PAT) zur Bestimmung der relativen PolyA-Länge: 1) jede mRNA wird mit einem 5'phosphorylierten und 3'aminogeblockten RNA Oligo (P1) ligiert und 2) mit einem zu P1 komplementären Primer P'1 revers transkribiert. 3) Das mit P'1 und einem mRNA spezifischen Primer (GS) amplifizierte PCR Produkt besitzt eine zur eingeschlossenen PolyA-Länge proportionale Produktgröße. (B) Es wurden 4 im Array als signalreduziert sowie 5 als nicht signalverändert bestimmte Transkripte aus frischen (0h) und gealterten (3h) Eiern mittels des RL-PAT analysiert.* zeigt einen der Ligation vorangehenden RNaseH/Oligo(dT) Verdau an. Die Kontrolle -Lig entspricht einem Ligationansatz ohne RNA; die -RT einem RT Ansatz ligierter RNA ohne reverse Transkriptase. Beide Kontrollen waren in allen Transkripten negativ. M gibt den DNA Längenstandard in bp an. Eine direkte Sequenzierung von *atp5a1* und *tpi1* ergab das aktuelle 3'Transkriptende (durch Pfeile angezeigt), das in frischen Eiern am PolyA Ende (kursive As) lag, in gealterten Eiern mehrere Nukleotide 5'aufwärts vom ehemaligen Ende des 3'NTR (weißer Kasten). (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Im Gegensatz zeigten die während der Alterung nicht signalveränderte Transkripte unabhängig von der PolyA-Länge in frischen Eiern keine PolyA-Verkürzung. Eine Ausnahme bildet melk, wo eine Verschiebung der PCR-Produktverteilung auf eine Deadenylierung hinweist (Abb. 15B). Da hier der PolyA auch nach Eialterung noch > 100 A lang bleibt, kann diese PolyA Veränderung in Oligo(dT) basierten Quantifizierungsmethoden nicht erkannt werden.

3.3.6 Transkriptverhalten in alternden Eiextrakten

Viele biologische Prozesse der Zelle finden ebenso in Eiextrakten statt, wodurch diese leichter zu analysieren sind. Es war daher von Interesse, ob die in gealterten Eiern beobachtete Transkriptdeadenylierung auch in Eiextrakten erfolgt. Hierzu befreite ich ca. 500 Eier mit Cystein von ihrer Gallerthülle, wusch sie mehrmals in MBS sowie einem Extraktionspuffer und lysierte sie durch Zentrifugation bei 20.000 g. Dadurch erfolgte eine Auftrennung des wässrigen Cytosols, des Eiextraktes, vom Dotter sowie festen Zellstrukturen. Der so gewonnene Eiextrakt ließ ich für 3 h altern und bestimmte die relative Menge an polyadenylierter mRNA in frischen sowie gealterten Extrakten mittels qRT-PCR. Transkriptänderungen in gealterten Extrakten verglich ich dann mit denen in gealterten ganzen Eiern aus der gleichen Eiablage. Wie aus Abb. 16 ersichtlich, wurde in 3 h gealterten ganzen Eiern die Menge polyadenylierter Transkripte im Vergleich zu frischen Eiern stark reduziert, im 3 h gealterten Extrakt verglichen zum frischen Extrakt jedoch nur marginal. Es stellte sich die Frage, ob Transkripte bereits während der Extrakterstellung deadenyliert werden. Hierzu verglich ich die relative Transkriptmenge in frischen ganzen Eiern mit der im frischen Extrakt (Abb. 16, graue Balken). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass während der Extraktpräparation bereits eine leichte Reduzierung der Menge polyadenylierter Transkripte erfolgt. Diese kann jedoch die im gealterten Extrakt fehlende Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA, wie sie während der Eialterung zu sehen ist, nicht vollständig erklären.

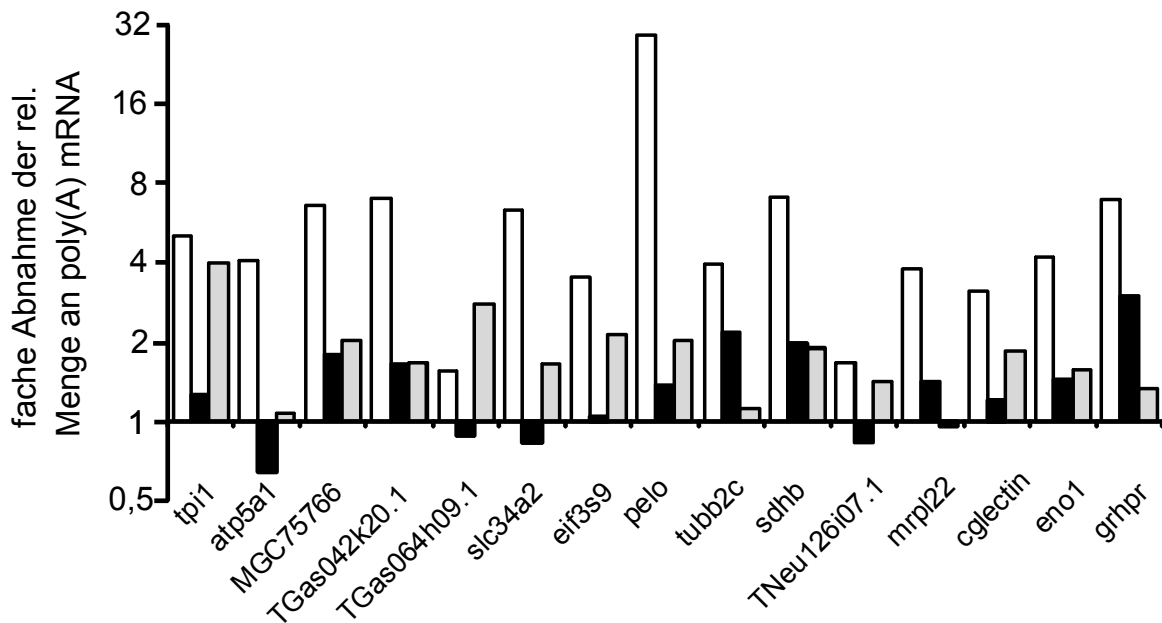


Abb. 16: Reduzierung der Menge polyadenylierter Transkripte während Eialterung, Extraktherstellung und Extraktalterung im Vergleich.

Eier gleicher Eiablegung wurden als ganze Eier 3 h in MBS inkubiert bzw. aus frischen Eiern ein Extrakt hergestellt und dieser 3 h gealtert. Veränderungen der relativen Menge an polyadenylierter mRNA wurden zwischen frischen und 3 h gealterten ganzen Eiern (weiße Balken), zwischen frischem und 3 h gealtertem Extrakt (schwarze Balken) und zwischen frischen ganzen Eiern und frischem Extrakt (graue Balken) im qRT-PCR Assay quantifiziert.

Um die qRT-PCR Ergebnisse zu überprüfen, untersuchte ich 4 während der Eialterung signalreduzierte Transkripte im RL-PAT (Abb. 17). Hier fand ich in ganzen gealterten Eiern im Vergleich zu frischen eine PolyA-Verkürzung, die jedoch nicht stark war. Die *tpi1* und *grhpr* mRNA im frischen Extrakt zeigten zu frischen Eiern vergleichbare PolyA-Längen. Das *atp5a1* zeigte im frischen Extrakt eine breitere Verteilung der Poly-Länge als in frischen Eiern. Es scheint, dass ein Teil der mRNA im Vergleich zu frischen ganzen Eiern gleich lange PolyA behält, ein anderer eine Verkürzung des PolyA zeigt, was auf eine teilweise Deadenylierung während der Extraktherstellung hinweist. Eine deutliche Deadenylierung von Transkripten während der Extraktalterung konnte ich nicht beobachten.

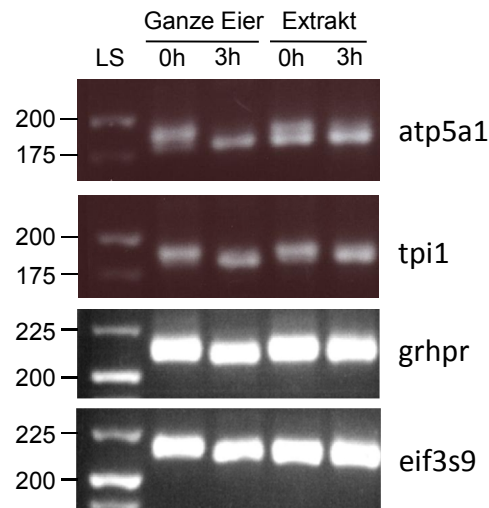


Abb. 17: PolyA-Längenbestimmung in frischen sowie gealterten Eiern bzw. Extrakten im Vergleich.

4 im Array als signalreduziert bestimmte Transkripte wurden mittels des RL-PAT in frischen (0h) und gealterten (3h) ganzen Eiern sowie in aus der gleichen Eiablage stammenden Extrakten untersucht. LS gibt den Längenstandard (Marker) in bp an. Der Abstand zwischen den Banden des Längenstandards beträgt je 25 bp.

Um zu testen, ob das Entfernen der Gallerthülle die während der Alterung beobachteten Transkriptänderungen beeinflusst, alterte ich mit Cystein enthüllte sowie nicht enthüllte Eier gleicher Eiablage parallel und verglich Änderungen in der Menge polyadenylierter mRNA mittels qRT-PCR miteinander. Wie aus Abb. 18 ersichtlich zeigen gealterte Eier mit und ohne Gallerthülle eine vergleichbare Abnahme der relativen Transkriptmenge.

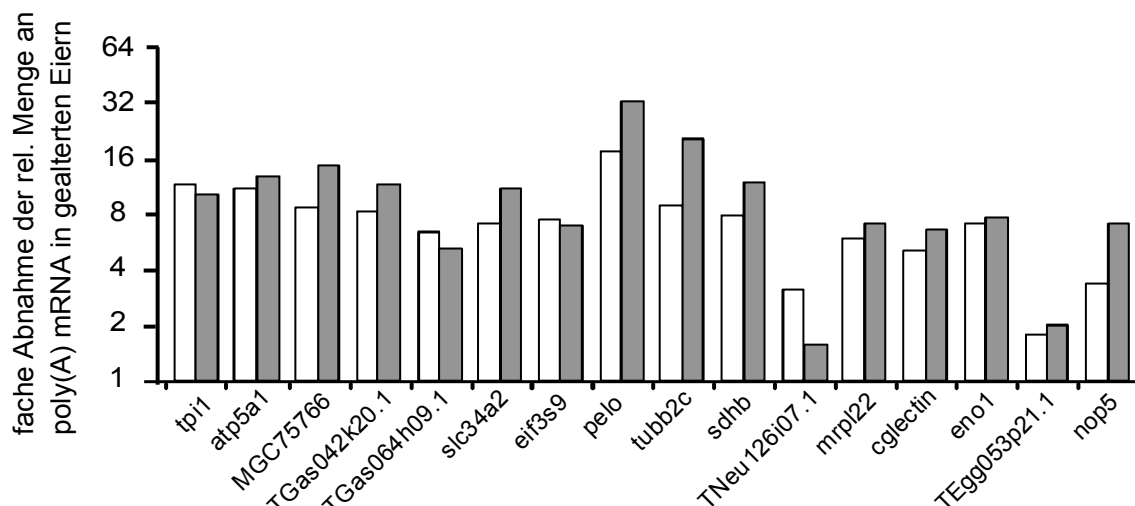


Abb. 18: Reduzierung der Menge polyadenylierter Transkripte in enthüllten sowie nicht enthüllten gealterten Eiern im Vergleich.

Eier gleicher Eiablage wurden nach Entfernung der Gallerthülle mit Cystein (graue Balken) bzw. unbehandelt (weiße Balken) 3 h in MBS altern gelassen und die Änderungen der rel. Menge polyadenylierter Transkripte mittels qRT-PCR analysiert. Die hier untersuchten Eier stammen von einem anderen Weibchen ab, als in Abb. 16 und 17.

Zusammenfassend zeigt der Versuch, dass das Vorhandensein der Gallerthülle den während der Eialterung beobachteten Deadenylierungsprozess nicht beeinflusst. Dieser ist in alternden Extrakten jedoch nicht zu sehen, sondern erfordert eine intakte Eizelle.

3.3.7 *In silico* Analyse der 3' nicht translatierten Regionen

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollten mit Hilfe der Bioinformatik eventuelle gemeinsame Charakteristika der während der Alterung veränderten Transkripte aufgespürt werden. Da die Translationskontrolle über PolyA-Längenregulierung meist durch die 3' nicht translatierte Region (NTR) der jeweiligen Transkripte bestimmt wird, analysierte ich von allen Transkripten, deren Sondensätze im Array als signalreduziert, nicht verändert bzw. signalerhöht bestimmt wurden und eine Ref-Seq Transkript ID besaßen die entsprechenden 3'NTR. Hierzu lud ich die 3'NTR-Sequenzen anhand ihrer Ref-Seq Transkript ID, die in der na30 Affymetrix Annotation den einzelnen Sondensätzen zugeordnet war, aus dem UCSC Genome Browser herunter.

3.3.7.1 Signalverminderte Transkripte besitzen eine kurze 3'NTR-Länge

Durch eine Zuordnung der 3'NTR-Länge zum Grad der alterungsbedingten Signaländerung im Array fand ich eine inverse Korrelation zwischen dem Grad der Signalminderung und der 3'NTR-Länge (Abb. 19). Das bedeutet, je mehr das Signal vermindert vorlag, desto kürzer war die mediane 3'NTR bzw. je länger die 3'NTR desto weniger signalverminderte Transkripte waren zu finden. So zeigten Transkripte, die mehr als 4 fach signalreduziert waren, eine kurze 3'NTR mit einem Median von nur 180 nt, der signifikant kürzer war als die mediane Länge von 296 nt bei weniger als 4 fach signalreduzierten, von 432 nt bei nicht signalveränderten sowie 543 nt bei signalverstärkten Transkripten.

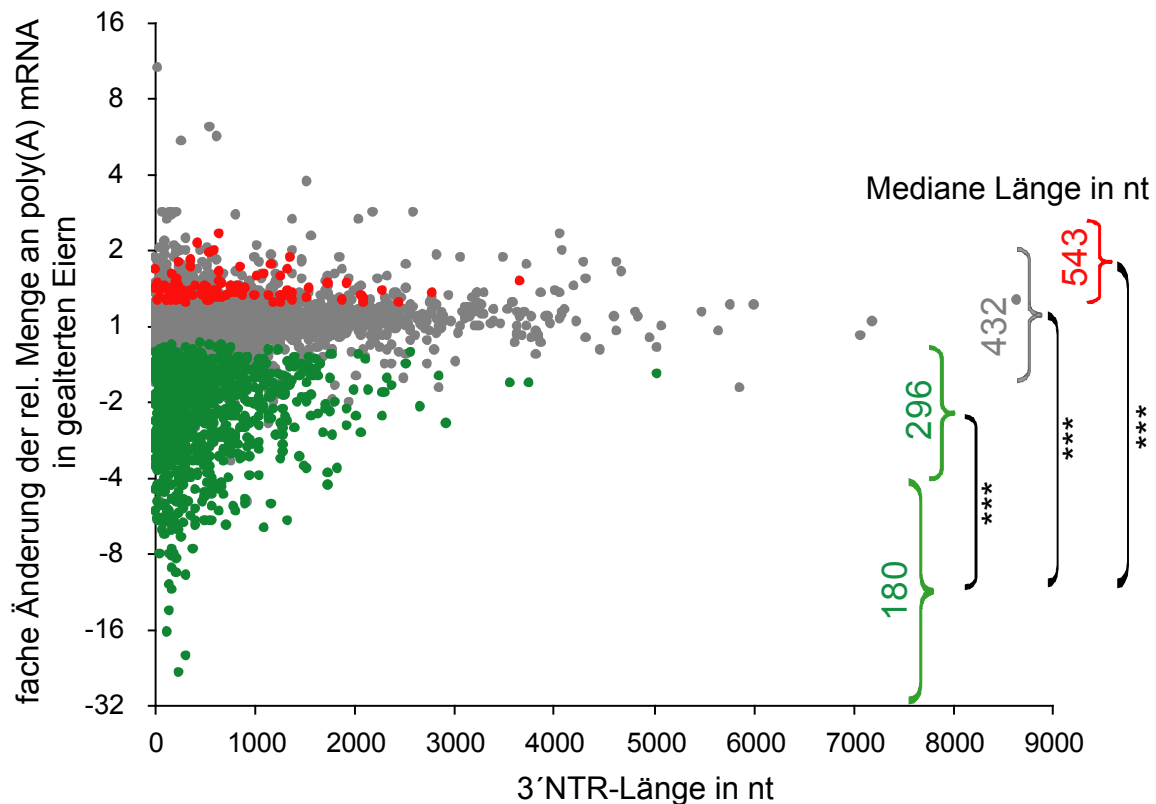


Abb. 19: Reduzierung der Transkriptsignale korreliert mit einer kurzen 3'NTR-Länge.

Aufgetragen ist die Veränderung der Signalstärke einzelner SONDENSÄTZE im Microarray während der Eialterung gegen die Länge der 3'NTR der entsprechenden Transkripte. SONDENSÄTZE wurden anhand ihrer Signaländerung in 4 Gruppen eingeteilt; in ≥ 4 fach (N=125) bzw. < 4 fach (N=1009) reduziert (grün), nicht verändert (grau, N=4050) und verstärkt (rot, N=107). Diese sind in Klammern zusammengefasst und die mediane 3'NTR-Länge der jeweiligen Gruppe angegeben. Mittels des Mann-Whitney Tests wurden die 3'NTR-Längen der ≥ 4 fach verminderten Gruppe gegen alle restlichen Gruppen verglichen (***) entspricht einem p-Wert von $< 0,001$). (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

3.3.7.2 Während der Alterung signalreduzierte Transkripte sind an CPE und PAS unterrepräsentiert

In *Xenopus* Oozyten ist an zahlreichen Studien nachgewiesen worden, dass die Polyadenylierungskontrolle über regulatorische Elemente in den 3'NTR erfolgt. Diese enthalten konservierte Sequenzmotive, die von spezifischen die Translation regulierenden Proteinen gebunden werden. Die Polyadenylierung maternaler Transkripte erfolgt u.a. über das Musashi bindende Element (MBE), die Translation kontrollierende Sequenz (TCS) sowie das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE). Alle diese Elemente sind in räumlicher Nähe zum Polyadenylierungssignal (PAS) beschrieben worden (siehe Übersichtsartikel MacNicol und MacNicol, 2010). Das kanonische PAS AAUAAA wurde beim

Menschen stark konzentriert 20 nt vom 3' Ende entfernt gefunden, während verwandte nicht kanonische Polyadenylierungssignale konzentriert oder breit verteilt in den letzten 50 nt am 3' Ende vorkommen können (Beaudoing *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2005). Um zu analysieren, ob die Präsenz dieser Elemente mit der Transkriptsignalreduzierung während der Eialterung im Zusammenhang steht, untersuchte ich alle während der Alterung veränderte Transkripte auf das Vorkommen der oben genannten regulatorischen Elemente. Da im Gegensatz zum Menschen die Lokalisation von PAS in *Xenopus* Transkripten unbekannt war, analysierte ich nur die PAS, die in den letzten 100 nt eines Transkripts vorkamen. Ähnlich dem humanen Hexanukleotid AAUAAA lagen in *X. tropicalis* 91,5 % aller gefundenen kanonischen PAS 11 - 30 nt bzw. 78,6 % 16 - 25 nt vom 3' Ende entfernt. Laut Literatur liegen das MBE, die TCS sowie das CPE in einem Abstand bis ca. 100 nt vom kanonischen PAS entfernt (Pique *et al.*, 2008; MacNicol und MacNicol, 2010). Daher suchte ich nach diesen Motiven in den letzten 120 nt der 3'NTR. Hierzu klassifizierte ich die signalverminderten Transkripte entsprechend dem Grad der Signalveränderung in 3 Gruppen und benutzte alle signalverstärkten Transkripte als Referenzgruppe. Das MBE und CPE analysierte ich anhand jeweils 6, das TCS anhand 4 bekannter Motivsequenzen und suchte neben dem kanonischen PAS nach 12 weiteren nichtkanonischen PAS (Tab. 4).

Während MBE und TCS in allen 4 Transkriptklassen gleich häufig vorkamen, fand ich in den am stärksten verminderten mRNA eine signifikante Unterrepräsentierung von CPE (Abb. 20). So enthielten signalverstärkte Transkripte mit 30,2 % 3,3 fach öfter ein CPE als Transkripte, die mehr als 4 fach signalvermindert waren. Eine ähnliche Ungleichverteilung lag auch für das AAUAAA vor, das 59,4 % der signalverstärkten Transkripte enthielt, aber nur 36,7 % der mehr als 4 fach signalreduzierten mRNA. Dagegen war die Häufigkeit von Transkripten, die mindestens eines der 12 nonkanonischen PAS enthielten, in allen Gruppen ähnlich. Ob ein CPE haltiges Transkript ebenfalls ein AAUAAA aufzeigte, war in allen Gruppen etwa gleich. So hatten 50 % aller ≥ 4 fach signalreduzierten und 59 % aller signalverstärkten CPE haltigen Transkripte ebenfalls das kanonische PAS in ihrer Umgebung. Insgesamt besaßen 90 % der CPE haltigen Transkripte ein PAS (kanonisch oder nicht kanonisch) in ihrer Nähe.

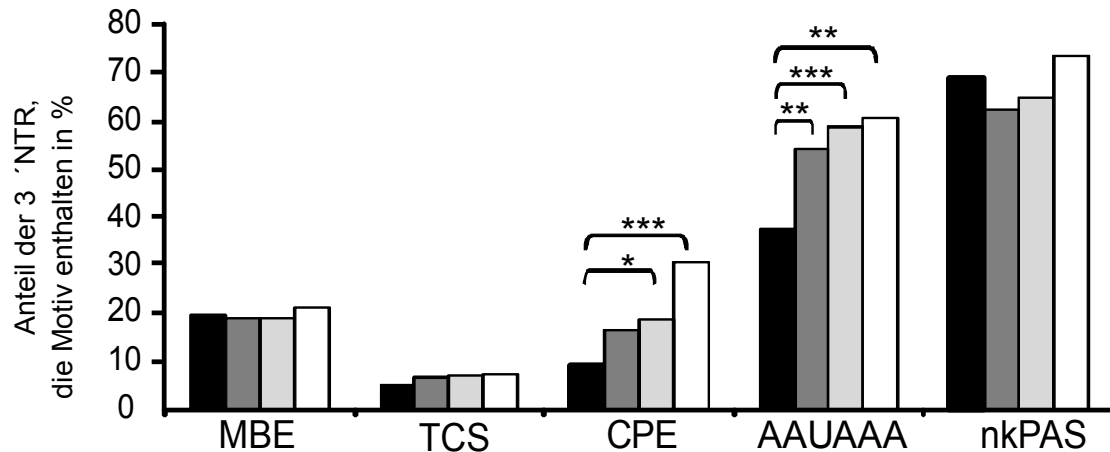


Abb. 20: Häufigkeit der Polyadenylierung regulierenden Elemente MBE, TCS, CPE und PAS in während der Eialterung veränderten Transkripten.

Transkripte wurden anhand ihrer während der Eialterung veränderten Signalstärke in 4 Klassen eingeteilt: ≥ 4 fach vermindert (schwarz, N=98); zwischen ≥ 2 fach und < 4 fach vermindert (dunkelgrau, N=403); < 2 fach vermindert (hellgrau, N=496) und verstärkt (weiß, N=96). Angegeben ist der Anteil an Transkripten in jeder Klasse, die mindestens ein MBE, TCS, CPE, kanonisches PAS (AAUAAA) bzw. ein nicht kanonischen PAS (nkPAS) besitzen. Das MBE, TCS und CPE wurden nur in den letzten 120 nt, die PAS nur in den letzten 100 nt der 3'NTR berücksichtigt. Ein Vergleich der ≥ 4 fach reduzierten Gruppe mit allen anderen ergab im Fishers Exakten Test p-Werte von $< 0,05$ für *, $< 0,01$ für ** und $< 0,001$ für ***. (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Desweiteren analysierte ich die Verteilung des AU reichen Elements (ARE), das während der Eireifung sowie in frühen Embryonen Deadenylierung induzieren kann (MacNicol und MacNicol, 2010). Ein weiteres die Translation reprimierendes Element ist das embryonale Deadenylierungselement (EDEN), das jedoch erst nach der Eibefruchtung eine Rolle spielt (Paillard *et al.*, 1998; Graindorge *et al.*, 2008). Da das Vorkommen von ARE und EDEN nicht an einer spezifischen Region innerhalb der 3'NTR definiert ist, berücksichtigte ich diese Motive in der gesamten 3'NTR der jeweiligen Transkripte. Das ARE analysierte ich anhand von 6 verschiedenen Motivsequenzen, das EDEN anhand einer (Tab. 4).

Da die einzelnen Gruppen unterschiedlich lange 3'NTR besaßen, variierte auch die Wahrscheinlichkeit ein Motiv per Zufall zu finden. So korrelierte die Häufigkeit des ARE nur mit der Länge der 3'NTR jedoch nicht mit der Transkriptklasse. In Transkripten mit einer ≤ 300 nt langen 3'NTR fand ich in 1,9 % der ≥ 4 fach reduzierten und 4,8 % der verstärkten Transkripte ein ARE, in Transkripten mit einer langen 3'NTR von > 900 nt dagegen in 37,5 % der ≥ 4 fach reduzierten und 45,7 % der verstärkten Transkripte das Element (Abb. 21). Eine signifikante Anreicherung

von ARE innerhalb einer 3'NTR-Längengruppe zwischen reduzierten und verstärkten Transkripten konnte ich mittel des Fischer's Exakten Tests ausschließen.

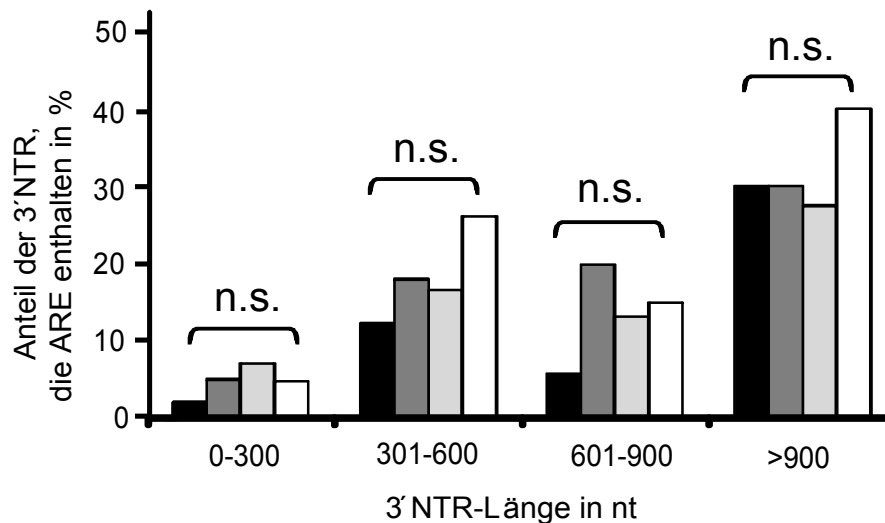


Abb. 21: Häufigkeit des deadenylierenden Elementes ARE in während der Eialterung veränderten Transkripten.

Transkripte wurden anhand ihrer während der Eialterung veränderten Signalstärke in 4 Klassen eingeteilt: ≥ 4 fach vermindert (schwarz, N=98); zwischen ≥ 2 fach und < 4 fach vermindert (dunkelgrau, N=403); < 2 fach vermindert (hellgrau, N=496) und verstärkt (weiß, N=96), sowie anhand der Länge ihrer 3'NTR in 4 Längengruppen: 0 – 300 nt (N=458); 301 – 600 nt (N=275); 601 – 900 nt (N=141) und > 900 nt (N=220). Angegeben ist der Anteil an Transkripten in jeder Klasse, die mindestens ein ARE in der gesamten 3'NTR besitzen. Vergleich der ≥ 4 fach signalreduzierten Gruppe mit signalverstärkten Transkripten über Fishers Exakten Test ergab keine Signifikanz (n.s.).

Das EDEN Element kam durchschnittlich in nur 2,5 % aller Transkripte vor. Aufgrund der geringen Häufigkeit war eine statistische Auswertung für EDEN nicht möglich. Eine Normierung der Anzahl der gefundenen Motive gegen die Gesamt-3'NTR-Länge der jeweiligen Transkriptklasse ergab jedoch, dass das Element mit 4,4 Motiven pro 10.000 nt in $< 4 \geq 2$ fach signalverminderten Transkripten im Vergleich zu 4,8 Motiven pro 10.000 nt in < 2 fach signalverminderten sowie in signalerhöhten Transkripten etwa gleichhäufig vorkam. In ≥ 4 fach signalverminderten Transkripten fehlte das EDEN vollständig.

3.3.7.3 Während der Eialterung signalverminderte Transkripte sind in während der Eireifung sowie nach der Befruchtung deadenylierten Transkripten angereichert

In *Xenopus tropicalis* sind Änderungen der polyadenylierten mRNA Fraktion während der Eireifung sowie nach der Befruchtung von Graindorge und seinen Kollegen in

Microarray Analysen charakterisiert worden. Dabei wurden Transkripte gemäß ihrem Polyadenylierungsverhalten in 7 Kategorien eingeteilt. Daher war es möglich, die in dieser Arbeit gemessenen Transkripte auf bereits bekannte Adenylierungsverhalten hin zu analysieren und diese in die 7 vordefinierten Kategorien einzuteilen (Abb. 22). Dabei wurde eine ungleiche Verteilung während der Alterung signalverminderter Transkripte offensichtlich. So sind in allen Kategorien, die durch Transkriptdeadenylierung während der Eireifung charakterisiert sind (Abb. 22, Kategorie 1, 6 und 8), während der Eialterung signalverminderte Transkripte signifikant überproportional vertreten. Erstaunlicherweise waren Transkripte, die erst nach der Befruchtung deadenyliert werden, ebenfalls in während der Alterung signalverminderten Transkripten angereichert (Abb. 22, Kategorie 5). Eine Anreicherung lag in den Kategorien 2, 3 und 4 dagegen nicht vor.

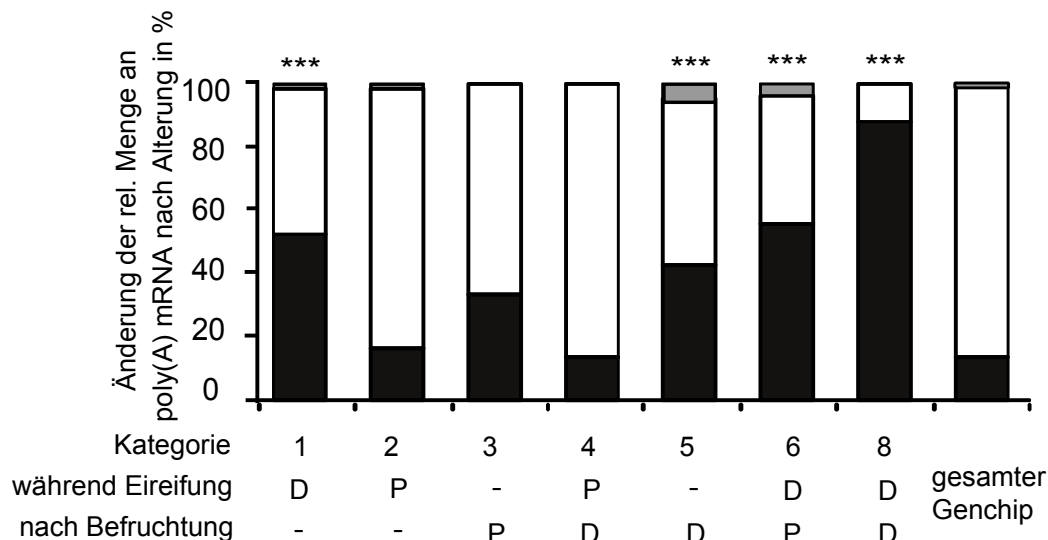


Abb. 22: Verteilung maternalen während der Eialterung signalverminderter mRNA gemäß bekannten Adenylierungsverhalten während Eireifung sowie nach Befruchtung.

Während der Eialterung als vermindert (schwarz), nicht verändert (weiß) bzw. als verstärkt (grau) bestimmte Transkripte wurden, je nachdem ob sie während der Eireifung bzw. nach Befruchtung poly-(P) oder deadenyliert (D) werden, in 7 Kategorien eingeteilt. Kategorie 7 ist nicht gezeigt, da dieses Adenylierungsverhalten nicht beobachtet wurde (Graindorge *et al.*, 2006). Signifikante Unterschiede wurden mittels des χ^2 Test zwischen dem Anteil an verminderten Transkripten in den einzelnen 7 Kategorien verglichen zu dem Anteil an signalverminderten Transkripten in allen im Microarray während der Eialterung bestimmten Transkripten (Balken ganz rechts) berechnet. *** entspricht einem p-Wert von $< 0,0001$. Eine detaillierte Liste aller hier angereicherten während der Alterung reduzierten Transkripte, die verschiedenen biologischen Prozessen angehören, ist in Tab. A3 im Anhang zu finden (Abbildung modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

4 Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der DNA Methylierung spezifischer Gene in Embryonen aus gealterten Eiern sowie die Analyse des maternalen Transkriptom in postovulatorisch alternden Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus tropicalis*.

In *Xenopus* ist bisher nur die preovulatorische Alterung analysiert worden (Witchi und Laugens, 1963; Mikamo, 1968; Mikamo und Hamaguchi, 1975). Da die Frösche keine Inzuchttiere sind, wird das Studium der preovulatorischen Alterung durch eine hohe biologische Varianz durch den notwendigen Vergleich verschiedener Weibchen bzw. gleicher Weibchen aber weit auseinander liegender Zeiträume erschwert. Diese Problematik entfällt bei der Analyse postovulatorischer Eialterung, weshalb der Frosch für das Studium der verzögerten Befruchtung im Gegensatz zur verzögerten Ovulation sehr zu empfehlen ist. Weil die postovulatorische Eialterung in *Xenopus* bisher nicht untersucht ist, wurde in dieser Arbeit als Erstes das System von mir etabliert. Der folgende Abschnitt erklärt die Besonderheit dieses Modellsystems.

4.1 *Xenopus tropicalis* als Modellorganismus

Beim Frosch erfolgt die Ovulation durch die Injektion von hCG, das über die Ausschüttung von Progesteron die Eireifung induziert (Sive *et al.*, 2000). Man kann bei *Xenopus tropicalis* den Zeitpunkt der Ovulation an einer intensiv roten Kloake des Weibchens sowie dem Sichtbarwerden einzelner Eier sehr gut erkennen. Gelaicht wird durch einen mechanischen Stimulus z.B. durch eine Abdomenmassage des Weibchens. Dass die Besamung der Eier naturgemäß außerhalb des Körpers stattfindet ist ein entscheidender Vorteil von *Xenopus* als Modellorganismus gegenüber Säugern. Erstens sind die Eier sehr leicht zu gewinnen, ohne das Weibchen, im Gegensatz zur Maus, töten zu müssen. Zweitens können die Eier nach der Besamung in Leitungswasser aufbewahrt werden. Dagegen ist bei Säugern die Aufbewahrung von Embryonen in komplexen Medien notwendig, deren Zusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung hat

und somit ein zusätzliches Artefaktrisiko darstellt (Thélie *et al.*, 2007; Chason *et al.*, 2011).

In Säugern kann lediglich die frühe Embryonalentwicklung *in vitro* studiert werden, da spätere Stadien eine Einnistung in die Plazenta benötigen. Daher wäre eine gleichzeitige Bestimmung der Befruchtungsrate (*in vitro*) und der Fehlbildungs- bzw. Sterberate des Embryos bzw. Fetus (*in vivo*) äußerst aufwendig. Deshalb sind Folgen der Alterung von Säugeroozyten selten über die Preimplantationsstadien hinaus untersucht worden. Beim Frosch dagegen ist es durchaus leicht, die Embryonalentwicklung kontinuierlich zu verfolgen sowie gleichzeitig die Befruchtbarkeit zu bestimmen. Möglich wird dies nicht nur aufgrund der extrakorporalen Embryogenese, durchsichtigen Eihülle sowie praktischen Eigröße sondern auch, weil pro Eiablage bis zu 1000 Eier erhalten werden können. Hier zeigt sich der zweite wichtigste Vorteil von *Xenopus*, nämlich die Laichgröße. Sie erlaubt es, frische mit postovulatorisch gealterten Eiern derselben Eiablage zu vergleichen. Dies ist entscheidend, denn genetische Ausstattung sowie Alter der Weibchen bzw. unterschiedliche Konditionen wie Futter, Wassereigenschaft und Temperatur mögen die biologische Antwort auf die verspätete Befruchtung stark beeinflussen. Wie aus Abb. 11 ersichtlich variierte der Grad des Eipotenziolverlustes sowie der Transkriptsignalreduzierung nicht unerheblich zwischen den einzelnen Tieren aber auch zwischen Eiablagen desselben Weibchens im Abstand von 10 Monaten. Dagegen zeigten Transkriptomprofile verschiedener Eizellen derselben Eiablage ein höchst reproduzierbares Muster (Abb. 9B). Die starke biologische Varianz zwischen verschiedenen Tieren spiegelte sich sogar in der RNA Ausbeute wider, während diese sich zwischen alten und frischen Eiern wenig unterschied (Abb. 6A und 6B). In Säugern dagegen ist man selbst bei einer Superovulation auf eine kleine Oozytenanzahl limitiert. Dies macht das Vereinen von Oozyten verschiedener Tiere oft unerlässlich, was problematisch sein kann, da die Tiere unterschiedlich auf die hCG Injektion reagieren. Z.B. rechnet man bei der Maus mit dem Eisprung ca. 10 - 15 h nach hCG Gabe, (Polański, 1986; Tiveron *et al.*, 1992), so dass unterschiedlich stark gealterte Oozyten gerade das Studium der frühen Alterung erschweren können. Die Größe der Eiablage beim Amphibium erlaubt zudem, dass man Eier aus ein und demselben Laich sowohl zur Bestimmung des Eipotenzi als auch für zellbiologische bzw. molekulare Analysen verwenden kann. In Säugern dagegen weiß man meistens nicht, ob die während der Alterung beobachteten zell- bzw.

molekularbiologischen Veränderungen in befruchtbaren oder nicht mehr befruchtbaren Oozyten erfolgen, bzw. ob diese sich normal entwickelt hätten. Ob Eizellen befruchtbar wären oder nicht, mag aber einen entscheidenden Faktor für eine verlässliche Transkriptomanalyse darstellen. Wie in Abb. 7 und 8 ersichtlich zeigten befruchtbare und nicht befruchtbare Eier deutliche Unterschiede in der Verteilung sowohl totaler als auch von cRNA. Unabhängig vom Eialter zeigten befruchtbare Eier im Vergleich zu unfruchtbaren eine Veränderung der S18 und S28 rRNA. Auch bestand die cRNA aus nicht befruchtbaren Eiern hauptsächlich aus kurzen Fragmenten, was auf eine nicht intakte mRNA schließen lässt. Daher und weil mich frühe Alterungsprozesse in gut befruchtbaren Eiern interessierten, wurden zur Analyse maternalen mRNA nur solche Eier verwendet, die selbst gealtert noch gut befruchtbar waren.

Neben der Laichgröße stellt auch die Menge der isolierbaren RNA einen weiteren entscheidenden Vorteil dar, der das Vereinen von Eiern verschiedener Herkunft nicht erfordert. Die Größe des *Xenopus*eies, das im Vergleich zur Maus einen ca. 10-fach höheren Durchmesser besitzt, erlaubte mir eine Ausbeute von ca. 0,4 - 1,3 µg totaler RNA pro Ei (Abb. 6B). Bei Mausoozyten dagegen ist mit einer Ausbeute von nur 50 pg totaler RNA pro Eizelle zu rechnen. Die Größe des Eies ist eine Notwendigkeit den Amphibienembryo bis zum Stadium der freischwimmenden Larve mit Nährstoffen zu versorgen. Denn erst die freischwimmende Larve ist zur selbständigen Nahrungsaufnahme fähig. In Säugern dagegen wird der Embryo bereits früh über die Plazenta vom Muttertier ernährt, so dass keine großen Vorräte angelegt werden müssen.

Der Umfang der maternalen Vorräte schafft *Xenopus* einen weiteren Vorteil, nämlich die schnelle Embryonalentwicklung. Da zeitaufwendige mRNA-Synthesen bzw. -Prozessierungen bis zum Blastulastadium nicht erfolgen, können gap-Phasen umgangen werden und die Zellteilungen zwischen S- und M-Phasen schnell oszillieren (Kronja und Orr-Weaver, 2011). So dauert beim Frosch die erste Zellteilung nur 90, weitere Teilungen bis zur Blastula lediglich 30 min. Die Mauszelle beginnt dagegen bereits im Zwei-Zell Stadium die embryonalen Gene zu exprimieren und teilt sich nur ca. alle 22 h.

Tab. 7: Vorteile der Verwendung von *Xenopus* zum Studium der postovulatorischen Eialterung im Vergleich zur Maus als Modellorganismus.

	<i>Xenopus</i>	Maus
Gewinnung ovulierter Oozyten	Einfaches Abstreifen des Abdomens ohne das Tier zu töten	Präparation des Eileiters erfordert das Töten des Tieres
Anzahl Oozyten pro Ovulation	~ 100 - 1000 Eier je nach Weibchen Erlaubt Vergleiche innerhalb derselben Eiablage	~ 6 - 12 Oozyten pro Tier bzw. ~ 25 wenn superovuliert. Vereinen von Oozyten verschiedener Weibchen bzw. Vgl. zwischen verschiedenen Weibchen notwendig.
Oozyten-Durchmesser	800 µm	80 µm
Ausbeute totaler RNA pro Oozyte	~ 400 - 1300 ng	~ 50 pg
Aufbewahrung von Embryonen	Leitungswasser	Komplexe Medien, deren Komponenten die Embryonalentwicklung beeinflussen können
Verfolgen der Embryonalentwicklung	durchsichtige Eihülle, einfaches, unmittelbares Beobachten unterm Okular	<i>In vitro</i> nur bis zum Schlüpfen der Blastozyste möglich, danach Transfer in Muttertier notwendig folglich nicht weiter direkt beobachtbar
Dauer der Entwicklung	2-Zell Stadium 90 min hpi; Blastula 6 - 8 hpi; Organogenese abgeschlossen 4 dpf	2-Zell Stadium 24 hpi; Blastocyste 4 dpf

Trotz einzelner Unterschiede in der Reproduktions- und Entwicklungsbiologie der einzelnen Organismen ist die Oogenese sowie die frühe Embryonalentwicklung selbst in weit verwandten Arten hoch konserviert (Evsikov und De Evsikova, 2009). Ein Vergleich der *expressed sequence tags* (EST) zeigte, dass in einer ausgewachsenen Mausoozyte 80 % der vorhandenen mRNA auch in *Xenopus laevis* vorhanden sind (Evsikov et al., 2006). Auch mittels cross-species Hybridisierung von Rind und *Xenopus* Oozyten auf einem Maus Microarray Chip fand man, dass 74 % der in Mausoozyten vorhandenen maternalen mRNA mit denen in Rind und Frosch übereinstimmten. In diesen waren RNA-Stoffwechsel, RNA-Bindung und Ribonukleoproteinkomplex die am stärksten überrepräsentierten Gen-Ontologien (GO). Interessanterweise waren die Signalstärken in allen drei Spezies ebenfalls ähnlich. Das heißt, polyadenylierte mRNA, die in Mausoozyten in geringer bzw. hoher Anzahl vorlag, war in Rind und Frosch ebenfalls wenig bzw. stark vorhanden (Vallée et al., 2008). Insbesondere konserviert sind die Translation regulierende Elemente sowohl in ihren Sequenzen als auch ihrer Häufigkeit. So fand ich das kanonische PAS AAUAAA in durchschnittlich 54,3 % bzw. das häufigste nichtkanonische PAS AUUAAA in 22,4 % aller veränderten Transkripte vor, einer

Frequenz, die für Mensch und Maus ähnlich gefunden wurde (Beaudoing und Gautheret, 2001; Tian *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass die im Frosch während der Eialterung aufgezeigten Änderungen im Transkriptom ebenfalls in Säugern zu erwarten wären.

4.2 Potenzialverlust verzögert befruchteter Froscheier

Entgegen der allgemeinen Auffassung, zu spät besamte Eier würden nicht mehr befruchtet werden und absterben, beschreibt diese Arbeit eine Übergangszeit, in der gealterte Eizellen bereits stark an Potenzial verlieren können, ihre Befruchtungsfähigkeit sowie Aussehen jedoch unverändert vorliegen. Nicht besamte Eier blieben ca. 5 - 7 h morphologisch unauffällig. Erst ab ca. 5 - 7 h, als die Eizellen nicht mehr befruchtbar waren, begannen einzelne Eizellen ihre Pigmentierung zu verändern, aufzuquellen und ins apoptotische Stadium überzugehen, ähnlich wie in Hilken, 1997 beschrieben. Gleiches wurde in der Maus beobachtet. Während 13 h gealterte befruchtbare Oozyten frischen gleich aussahen, zeigten 24 h gealterte, nicht befruchtbare Oozyten spontane Furchungen sowie Fragmentierung innerhalb von 1 - 2 h nach Besamung (Lacham-Kaplan und Trounson, 2008). Eine spontane parthenogenetische Eiaktivierung wie in gealterten Säugeroozyten berichtet (siehe Übersichtsartikel Tarín *et al.*, 2000) konnte ich in *Xenopus* nicht beobachten. Nicht besamte Eier zeigten zu keinem Zeitpunkt zwischen Eiablage und Absterben Zellteilungen auf. Bis zu 3,8 h gealterte Eizellen waren frischen Eizellen zwar vergleichbar befruchtungsfähig, wiesen aber eine stark erhöhte embryonale Mortalität sowie Fehlbildungen auf. Das heißt, obwohl während der befruchtbaren Zeitspanne der Eizelle von außen keine Alterung anzusehen war, führte die verzögerte Befruchtung zu einer anormalen Entwicklung. Dies ist auf das Schwinden des Eipotenzials zurückzuführen, da eine Alterung von Spermien bereits in Vorversuchen in *Xenopus laevis* durch Prof. Dr. Gerhart Ryffel, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, ausgeschlossen wurde.

Weniger als 50 % der verspätet befruchteten Eier entwickelten sich bis zum Stadium 40 (Abb. 2B). Als Grund hierfür sind verschiedene fehlerhafte Entwicklungen während der Organogenese zu sehen, die so gravierend waren, dass sie zu einem progressiven Absterben der Embryonen führten. Die hier beobachtete Mortalität steht im Konsens zu früheren Beobachtungen. Bereits Pflüger beobachtete in *Rana*

temporaria, dass viele Eier „wenn sie auch die erste Entwicklung anfangen, doch nachträglich abstarben“ (Pflüger, 1882). Ein progressives Anhalten der Embryonalentwicklung wurde auch in gealterten Mausoozyten beobachtet. So ließen sich 13 h alte Oozyten im Vergleich zu frischen Eizellen zwar gleich häufig befruchten, erreichten jedoch immer seltener das 4-Zell, 8-Zell bzw. das Blastozystenstadium (Lacham-Kaplan und Trownson, 2008). Eine erhöhte embryonale Mortalität bei verzögerter Befruchtung ist ebenso in Maus (Sakai und Endo, 1988; Gullett *et al.*, 1998; Tarín *et al.*, 2002), Ratte (Blandau und Jordan, 1941), Hamster (Juetten und Bavister, 1983) sowie Forelle (Aegerter, 2004 und 2005) beschrieben worden.

Von den verspätet befruchteten Eiern, die das Larvenstadium erreichten, wiesen 50 % Fehlbildungen auf (Abb. 2B). Diese waren vielfältig und meistens gravierend wie das komplette Fehlen von Organen bzw. Körperteilen sowie Stauchung, Krümmung und Verdrehung des ganzen Körpers bzw. einzelner Körperpartien (Abb. 2C). Diese große Vielfalt schwerwiegender Missbildungen wurden auch in anderen Nichtsäuger-Vertebraten berichtet (Witschi, 1952; Witschi und Laguens, 1963; Aegerter *et al.*, 2004 und 2005), jedoch kaum in Plazentatieren. Das mag zu einem daran liegen, dass die meisten Studien zur Eialterung in Säugern nur bis zum Schlüpfen der Blastozyste geführt werden. Ausnahmen, wie die Langzeitstudien von Tarín zeigen leichte Fehlbildungen wie fehlende oder verwachsene Finger, Pfoten mit Knochenausstülpungen, kurze Schwänze sowie Fehlfarbigkeit des Fells (Tarín *et al.*, 2002). Andererseits dürfte eine solch hohe Fehlbildungsrate bei Säugern auch nicht zu erwarten sein, da in diesen die Implantierung sowie die Ausbildung der Plazenta als Kontrollmechanismen fungieren. In einem Versuch an Ratteneizellen berichtete Blandau, dass obwohl 70 % der gealterten Eier befruchtet wurden, nur 4 % der Versuchstiere schwanger wurden (Blandau, 1954). Der Grund hierfür lag wahrscheinlich in einer anormalen Embryonalentwicklung, die eine erfolgreiche Einnistung verhinderten. Vermutlich werden auch bereits eingenistete Embryonen bei schweren Defekten abgestoßen und die Schwangerschaft beendet, denn das Risiko eines Abortes ist bei verspätet befruchteten Oozyten erhöht (Pursley *et al.*, 1998; Wilcox *et al.*, 1998). Diese Kontrollinstanzen sind bei Säugern aus Sicht der Evolution sinnvoll. Denn die Kosten nicht lebens- bzw. fortpflanzungsfähige Nachkommen zu gebären würden bei Säugern, die als K-Strategen (K, Kapazität) geringe aber kostenintensive Nachkommen zeugen, weit mehr ins Gewicht fallen, als

bei Amphibien bzw. Fischen, die eher die r-Strategie in der Reproduktion verfolgen und auf eine hohe Reproduktionsrate (r)-setzen.

Die im Frosch beobachtete große Vielfalt diverser Fehlbildungen lässt zahlreiche Veränderungen auf molekularer Ebene erwarten. Die einzige anormale Entwicklung, die viele Larven aus gealterten Eier gemein hatten, war eine 20 - 30 % kleinere Körperlänge bei normalen Körperproportionen (Abb. 2D). Diese Entwicklungsverzögerung wurde auch in postovulatorisch gealterten Eiern in *Rana* (Witchi und Laguens, 1963), Maus (Tarín *et al.*, 1999), Ratte (Blandau, 1954) sowie Forelle (Aegerter *et al.*, 2004) beobachtet.

4.3 DNA Methylierung spezifischer Gene in Embryonen aus gealterten Eizellen

In Säugern wurde gezeigt, dass genomisch geprägte Gene während der Eialterung demethyliert werden (Imamura *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008). Dies führte zur Frage, ob die Eialterung beim Frosch ebenfalls die DNA Methylierung beeinflusse. Die genomische Prägung (*Imprinting*) ist allerdings bei Amphibien unbekannt. Auch findet in *Xenopus* im Gegensatz zu Säugetieren keine globale Genomdemethylierung statt. Das Genom verbleibt vor, während und nach der Aktivierung des embryonalen Genoms während der MBT hoch methyliert (Veenstra und Wolffe, 2001; Bogdanovic *et al.*, 2011). Dennoch nimmt der Gehalt an methylierten CpG in der späten Blastula um 40 % ab und wird subsequent während der späten Gastrula-Stadien wieder hergestellt (Stancheva und Meehan, 2000; Stancheva *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass die differentielle Methylierung der DNA für die Entwicklung von *Xenopus* essentiell ist (Meehan, 2003). Eine Inaktivierung der *Maintenance* DNA Methyltransferase xDnmt1 führt zur Demethylierung und vorzeitiger Expression embryonaler Gene (Stancheva und Meehan, 2000) während der pre-MBT Entwicklung. Dies zeigt, dass die DNA Methylierung an der Transkriptionsrepression des embryonalen Genoms vor der MBT beteiligt ist. Ebenso fanden Stancheva *et al.*, dass die Gene *Xbra* und *c-Myc*, die während der Mid Blastula Transition (MBT) transkriptionsaktiviert werden zur gleichen Zeit in ihren Promoterregionen demethyliert werden (Stancheva *et al.*, 2002). Während der Gastrulation jedoch werden die Transkriptionkontrolle und die DNA Methylierung entkoppelt, so dass auch methylierte Promoter transkribiert werden (Bogdanovic *et al.*, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Analyse der DNA Methylierung die Gene *Xbra*, *c-Myc* und *cardiac Actin* ausgewählt, da von diesen Genen Methylierungsmuster für Oozyten, Blastula und Gastrula in *X. laevis* bekannt waren. Ich analysierte CpG reiche Regionen dieser 3 Gene in Blastula und Gastrula, die aus frisch sowie verspätet befruchteten Eiern stammen. Ich fand, dass alle 3 Gene in allen untersuchten Stadien keine Unterschiede in der Methylierung zwischen Embryonen aus frischen bzw. gealterten Eizellen besaßen. Damit liegt ein Einfluss der Alterung auf die DNA Methylierung dieser Gene nicht vor.

Ebenso stellte ich fest, dass zu allen Entwicklungszeitpunkten zwischen 3,5 und 10 hpi, d.h. sowohl in Blastula als auch Gastrula, *cardiac Actin* exakt gleich methyliert bzw. *Xbra* und *c-Myc* demethyliert blieben (Abb. 5). Dieses Ergebnis weicht von der in Stancheva *et al.*, 2002 gemachten Beobachtung ab, indem ich keine Veränderungen der DNA Methylierung zwischen Blastula und Gastrula fand. Dies mag hauptsächlich damit zusammenhängen, dass ich *X. tropicalis* untersuchte, Stancheva *et al.* aber *X. laevis*. Obwohl die beiden Spezies nah verwandt sind, unterschieden sich die Promotorregionen von *X. laevis* und *X. tropicalis* entscheidend. *c-Myc* und *cardiac Actin* unterschieden sich zwischen *X. tropicalis* und *X. laevis* sowohl bezüglich ihrer Sequenz als auch in der CpG Verteilung wesentlich. Ich fand z.B. in der Promoterregion -500 bis +1 von *cardiac Actin* in *X. tropicalis* nur 2 CpG statt 10 wie in *X. laevis*. Im promotornahen Bereich -500 bis +1200 von *c-Myc* lag in *X. laevis* eine CpG reiche Region zwischen -458 bis 1186 vor, in *X. tropicalis* dagegen zwischen -204 bis -1 und +19 bis +200. Lediglich für *Xbra* entsprach der von mir analysierte Bereich dem Abschnitt zwischen CpG 279 bis CpG 375 in *X. laevis* (Vgl. Abb. 5 mit Stancheva *et al.*, 2002, Fig. 3). Aber auch in *Xbra* fehlen *X. tropicalis* CpG reiche Regionen, während *X. laevis* eine zwischen -177 bis +299 vorweist.

Diese Unterschiede spiegeln die generelle Problematik von Sequenzvergleichen zwischen unterschiedlichen Arten wider, da oft z.B. durch repetitive Sequenzen *loci* bzw. Abstände zwischen selbst nah verwandten Spezies stark variieren können. Deswegen wurde in *X. tropicalis* nicht eine möglichst positionsähnliche Stelle zu der in *X. laevis* gesucht, sondern zur Analyse je ein Bereich gewählt, der bei einer Produktgröße von maximal 500 bp möglichst nah am Promotor eine möglichst hohe Anzahl an CpG beinhaltet. Folglich wurde von *cardiac Actin* eine gänzlich andere Region als in *X. laevis* untersucht, nämlich am 2. Exon, da hier zwischen +1580 und

+1764 eine CpG reiche Region vorlag (Abb. 4). Von *cardiac Actin* wurde also nicht die Promotor- sondern die Genregion analysiert. Letztere zeigte in *X. laevis* im Gegensatz zur Promotorregion keine Änderung der DNA Methylierung zwischen den einzelnen Stadien (Stancheva *et al.*, 2002), was meinem Ergebnis entspricht.

Im Hinblick darauf, dass die Expression dieser 3 Gene mit ihrer Methylierung korreliert (Stancheva und Meehan, 2000; Stancheva *et al.*, 2002), stimmen die von mir gefundenen DNA Methylierungsergebnisse mit den in Xenbase (Bowes *et al.*, 2010) ersichtlichen Expressionzeitfenstern aller 3 Gene überein. So wird *cardiac Actin* erst in frühen Neurula-Stadien exprimiert und wurde von mir zum Zeitpunkt ihrer Transkriptionrepression als methyliert bestimmt (Abb. 5C). *Xbra* und *c-Myc* dagegen werden während der MBT exprimiert. In Übereinstimmung hierzu fand ich diese demethyliert vor (Abb. 5A und B). *Xbra* z.B. wird laut Xenbase zwischen Stadium 8 - 9 aktiviert, in *X. laevis* zwischen 8 - 10. Da Änderungen der DNA Methylierung der Transkriptionsaktivierung meist vorausgehen, verwundert es nicht, dass ich in den Blastulastadien 7 - 8, also kurz vor Transkriptionsaktivierung die DNA demethyliert vorfand. In *X. laevis* dagegen wurde laut Xenbase die Transkriptionsaktivierung von *Xbra* zwischen Stadium 8 - 10 beschrieben, die methylierte Promotorregion durch Stancheva *et al.* dagegen im wesentlich früheren Stadium 6,5 berichtet. Zusammenfassend zeigt der Versuch, dass Methylierungsergebnisse zwischen den beiden *Xenopus*arten nur bedingt vergleichbar sind und dass keine Änderungen im Methylierungsmuster in Embryonen aus verzögert befruchteten Eiern gefunden wurden.

4.4 Postovulatorische Alterung führt zur Deadenylierung zahlreicher Transkripte

In dieser Arbeit wurden die Vorräte maternaler mRNA in postovulatorisch gealterten Eiern erstmals mittels Microarray und qRT-PCR umfangreich analysiert. Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass gealterte Eizellen, die zwar noch gut befruchtbar sind, jedoch ein hohes Risiko für anormale Entwicklung beinhalten, ein stark verändertes Transkriptom aufweisen. Über 15 % der gemessenen SONDENSÄTZE zeigten in gealterten Eiern eine Signalstärkenänderung. Von diesen waren 174 SONDENSÄTZE signalerhöht und 1785 SONDENSÄTZE signalvermindert (Tab. 6). Von den signalerhöhten SONDENSÄTZEN zeigten lediglich 9 eine mehr als 2 fach erhöhte

Signalstärke, d.h. die meisten waren nur schwach signalerhöht. Ich vermute, dass es sich bei einigen der in gealterten Eiern als signalerhöht gemessenen Sondensätze um nicht veränderte Transkripte handeln mag. Aufgrund der starken Abnahme der Gesamtmenge polyadenylierter mRNA in gealterten Eiern dürfte in diesen eine reduzierte Gesamtsignalintensität des Array zu erwarten sein. Bei der Normierung auf eine Zielintensität von 1000 können daher Signalintensitäten in gealterten Eiern erhöht werden bzw. die Intensitäten in frischen Eiern erniedrigt, was künstlich signalerhöhte Sondensätze in gealterten Eiern zur Folge haben kann. Die Problematik dieser Normierung mag erklären wieso die Abnahme von Transkriptsignalen in der qRT-PCR stärker war als im Array (Abb. 10).

Anhand von 14 Transkripten, mit denen ich das Array validierte, konnte ich die Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA in 7 verschiedenen Weibchen reproduzieren, wobei ich ein Weibchen zweimal in einem Abstand von 10 Monaten verwendete. Alle 8 Experimente zeigten einen ausgeprägten Potenzialverlust während der Alterung, 7 von diesen auch eine deutliche Reduzierung der Transkriptsignale (Abb. 11). Der Grad des Potenzialverlustes war der Stärke der Signalreduzierung jedoch nicht proportional, was einerseits die hohe biologische Varianz der Nicht-Inzucht Tiere widerspiegelt, andererseits darauf hindeutet, dass die Abnahme in der Menge polyadenylierter Transkripte einen aber nicht den einzigen Grund für den Potenzialverlust darstellen mag. Dennoch zeigt der Versuch, dass Oozyten geringerer Qualität veränderte mRNA aufweisen. Eine Beobachtung, die in schlechteren Eiern generell vorzukommen scheint, ob nun durch Beeinflussung der Ovulation (Bonnet *et al.*, 2007), durch postovulatorische Alterung (Aegerter *et al.*, 2004 und 2005; Zhang *et al.*, 2010 a) oder Alter der Mutter (Hamatani *et al.*, 2004; Grondahl *et al.*, 2010) hervorgerufen.

Die Transkriptreduzierung erfolgte unter verschiedenen Alterungsbedingungen. Eine Aufbewahrung der Eier in MBS bzw. in feuchter Kammer wies keine Unterschiede auf (Abb. 12). So konnte ich ausschließen, dass die beobachteten molekularbiologischen Änderungen durch das Medium bedingt seien und nicht durch die Alterung an sich (zum Vergleich siehe Tarín *et al.*, 2000; Lacham-Kaplan und Trounson, 2008). Die Aufbewahrung der zu alternden Eier in MBS war notwendig, um ein Aufquellen der Gallerthülle zu verhindern. Ein alternatives Entfernen der Gallertschicht wäre nicht erwünscht, da erst der Kontakt mit der Gallerthülle das Spermium befähigt die Eizelle zu befruchten. Diese Spermien-Kapazitation ist

artspezifisch und verhindert eine artfremde Befruchtung (Hausen und Riebesell, 1991).

Häufig findet man Änderungen in gealterten Eiern in Abhängigkeit davon, ob sie *in vitro* oder *in vivo* gealtert waren. So wurde z.B. Oozytenfragmentierung und erhöhte Leucinaufnahme in der Maus (nach Tarín *et al.*, 2000) sowie anormale Mikrotubuli-Anordnung im Kaninchen (Adenot *et al.*, 1997) nur in *in vitro* aber nicht in *in vivo* gealterten Oozyten gefunden. Dagegen fand ich sowohl in den *in vitro* als auch *in vivo* gealterten Eiern einen Potenzialverlust sowie eine ähnliche Veränderung der Transkriptsignale (Abb. 13). Eine *in vivo* Alterung in *Xenopus* ist jedoch mit der Unsicherheit verbunden, dass die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gelaichten Eier unterschiedlich gereift sein können und somit die *in vivo* Alterung als Modell zur Untersuchung der postovulatorischen Alterung nicht zu empfehlen ist. Der Versuch weist aber darauf hin, dass es sich bei der Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA um eine intrinsische Eigenschaft der alternden Oozyte handelt.

Die Änderungen der Transkriptmenge waren sichtbar, wenn Oligo(dT)₂₀, jedoch nicht, wenn *random* Hexanukleotid vermittelte cDNA verwendet wurde (Abb. 14). Das zeigt, dass die im Array gemessene Signaländerung auf eine Deadenylierung der maternalen mRNA zurückgeht, die Transkripte aber vorhanden blieben. Dass die Transkripte deadenyliert aber nicht degradiert wurden, konnte ich über die Bestimmung der PolyA-Länge einzelner Transkripte direkt bestätigen. Die RL-PAT Analyse 4 zufälliger Transkripte, die in gealterten Eiern mehr als 4-fach signalreduziert vorlagen, zeigte, dass alle einen kurzen PolyA besaßen, der während der Alterung vollständig deadenyliert wurde. In zwei Transkripten erfolgte die Deadenylierung sogar über das PolyA hinaus, indem 5 - 7 Nukleotide der 3'NTR verdaut wurden (Abb. 15B). Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit der Aktivität von Deadenylasen in Oozyten (Körner *et al.*, 1998; Cooke *et al.*, 2010). Transkripte, deren SONDENSÄTZE im Microarray dagegen als unverändert gemessen wurden, besaßen sowohl lange als auch kurze PolyA, die während der Alterung nicht deadenyliert wurden. Eine Ausnahme bildet die *melk* mRNA, wo eine geringe Verschiebung einer breiten Längenverteilung ihres PCR-Produktes auf eine Deadenylierung hinweist (Abb. 15B). Diese Diskrepanz ist auf die unterschiedliche Bestimmungsmethodik zurückzuführen: Im Gegensatz zum RL-PAT werden mit Oligo(dT) basierten Messmethoden leichte Adenylierungsänderungen an bereits langen PolyA, die nach der PolyA-Längenänderung ebenfalls lang bleiben, nicht

erfasst. Diese Problematik beschreiben bereits Graindorge *et al.*, die im RL-PAT eine Verlängerung eines bereits langen PolyA zwar erkannten, die entsprechende mRNA in der Microarray-Analyse aber keine Änderung der Signalstärke aufwies (Graindorge *et al.*, 2006).

Eine Deadenylierung von mRNA, die nicht zu ihrer Degradierung führt, ist typisch für Zellen, in denen entweder keine Transkription stattfindet, Transkription und Translation räumlich weit entfernt liegen bzw. die Proteinexpression schnell erfolgen muss. Dies gilt vor allem für Oozyten, aber auch für Zellen des neuronalen Systems (Andreassi und Riccio, 2009; Richter, 2010). Die Proteinexpression wird statt über den Auf- bzw. Abbau von mRNA über ihren Polyadenylierungsgrad reguliert. Polyadenylierte mRNA werden translatiert, deadenylierte Transkripte sind translationsinaktiv. Die Degradierung der mRNA erfolgt erst während der Aktivierung des embryonalen Genoms. So nimmt bei *Xenopus* zwar während der Reifung der Gehalt an polyadenylierter RNA um 40 % ab (Sagata *et al.*, 1980), die Degradierung der maternalen Transkripte beginnt aber erst während der MBT, wenn sich die Zellteilungshäufigkeit verlangsamt und die Transkription beginnt (Voeltz und Steitz, 1998; Audic *et al.*, 2001). Es war von Interesse, ob die in gealterten Eiern stattfindende Transkriptdeadenylierung auch in Eiextrakten erfolgt. Eine Reproduktion des Deadenylierungsprozesses in Extrakten hätte den Vorteil, dass er in diesen durch Zugabe von Inhibitoren bzw. anhand von RNA-Konstrukten relativ einfach untersucht werden könnte. Die Extrakte aus *Xenopus*-Eiern werden über eine durch Zentrifugation induzierte Zelllyse hergestellt. Diese Methode ist sehr schonend, weshalb Organellen intakt bleiben und die meisten zellbiologischen Prozesse weiterbestehen. So werden Eiextrakte u.a. auch zur Analyse von Translation (Matthews und Colman, 1991) und Alterungsprozessen (Newmeyer *et al.*, 1994; Tsuchiya und Yamashita, 2011) verwendet. Dennoch konnte ich die in gealterten Eiern beobachtete Abnahme der Transkriptsignale während einer 3 h Inkubation der Extrakte nicht feststellen. Zum Teil könnte bereits während der zeitaufwändigen Extraktpräparation mRNA deadenyliert bzw. degradiert sein, da zwischen frisch hergestelltem Extrakt und frischen Zellen eine Abnahme der Transkriptsignale zu sehen war (Abb. 16). Das Nicht-Beobachten der für alternde Eier typischen Deadenylierung in alternden Extrakten kann durch viele Faktoren bedingt sein. Zum Beispiel könnte eine mögliche Änderung der Magnesiumionen-Konzentration, wie das für freie Calciumionen in Extrakten bekannt ist (Matthews und Colman, 1991),

die Transkriptdeadenylierung beeinträchtigen, da die PARN Deadenylase für ihre Katalyseaktivität freie Magnesiumionen benötigt (Copeland und Wormington, 2001; Balatsos *et al.*, 2009). Vermutlich mag die Trennung von Zellkomponenten bzw. Molekülen, die beim Deadenylierungsmechanismus interagieren, durch die Ultrazentrifugation eine Rolle spielen. Eine Möglichkeit die Kompartimenttrennung zu verhindern wäre, ganze Eier mechanisch aufzubrechen und das Homogenat altern zu lassen, wodurch jedoch Organellen beschädigt werden können. Eine 3 h Inkubation von Homogenaten aus enthüllten sowie nicht enthüllten Eiern führte daher zu einer kompletten Degradierung der mRNA. In frischen Homogenaten konnte ich nämlich die bisher untersuchten 14 Transkripte in üblicher Signalstärke detektieren. In gealterten Homogenaten dagegen war keine einzige dieser mRNA in der qRT-PCR mehr nachweisbar (Ergebniss nicht gezeigt). Das bedeutet, die für die Eialterung charakteristische Transkriptdeadenylierung erfolgt nur in ganzen Zellen. Die Verwendung von zellfreien Systemen zur funktionellen Untersuchung des für alternde Eizellen typischen Deadenylierungsprozesses ist daher nicht geeignet.

4.5 Die während der Eialterung signalverminderten mRNA sind hauptsächlich durch Haushaltsgene kodiert

Es war von Interesse zu sehen, welchen funktionellen Gruppen die während der Alterung signalverminderten Transkripte angehören. Hierzu verwendete ich das Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit (GO EAST) (Zheng und Wang, 2008). Die GO EAST Software besitzt jedoch die Problematik, dass hier signalreduzierte SONDENSÄTZE gegen den gesamten Microarray Chip verglichen werden. Oozyten sowie totipotente Zellen generell unterscheiden sich in ihrem Transkriptom jedoch bedeutend von somatischen Zellen, nach denen die handelsüblichen Genchips erstellt werden. Auf Oozyten speziell zugeschnittene Arrays, die es z.B. für die Maus gibt (Carter *et al.*, 2003) sind für *X. tropicalis* nicht erhältlich. Auch war eine Analyse der signalreduzierten SONDENSÄTZE gegen alle in den Froscheiern präsent gemessenen SONDENSÄTZE mit GO EAST nicht gegeben. Das unmittelbare Ergebnis dieser GO Analyse macht es daher schwer zu unterscheiden, ob jene gefundene Anreicherung auf die Eialterung zurückzuführen ist oder ob es sich um allgemein in der Oozyte angereicherte Transkripte handelt, bzw. darauf, dass diese GO in den Eiern am meisten als präsent gemessen wurden. Dennoch erlaubt GO EAST eine zuverlässige Zuordnung der signalreduzierten

Sondensätze zu Gengruppen. Allein unter den ≥ 2 fach signalreduzierten Sondensätzen fand ich mehr als 100 biologische Prozesse, die mehr als 2 fach angereichert waren und eine Signifikanz kleiner 0,01 besaßen (Tab. A2). Diese betrafen neben Translation, Transport und Lokalisation vor allem den Zellstoffwechsel. Unter den angereicherten Zellkompartimenten fand ich unter anderem Ribosomen, Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum sowie Mikrotubuli vertreten. Das heißt, die beobachtete Veränderung im Transkriptom betrifft eine große Anzahl unterschiedlicher Zellvorgänge. Die Diversität der signalveränderten Transkripte sowie der betroffenen Prozesse mag die große Bandbreite an Fehlbildungen in Embryonen aus gealterten Eiern erklären. Z.B. war die Prohibitin 2 mRNA, die für die Bildung der Neuralleiste essentiell ist (Osman et al., 2009), in gealterten *Xenopuseiern* signalvermindert. Diese wurde in Forellenoocyten geringer Qualität ebenfalls in reduzierter Menge gefunden (Bonnet et al., 2007). Welche der veränderten Transkripte das Eizellenpotenzial nun am meisten negativ beeinflussen, lässt sich aus der Fülle jedoch nicht vorhersagen. Viele der als verändert bestimmten mRNA könnten jedoch helfen, das, was auf zellbiologischer Ebene in gealterten Eizellen bekannt ist (Vgl. Kapitel 1.3) nun auf mRNA Ebene zu beleuchten. Z.B. wurden viele den GO Mikrotubuli und Zellzyklus zugehörige Transkripte während der Alterung signalvermindert. Potenzielle Veränderungen des Cytoskeletts können zu anomaler Abschnürung des 1. Polkörperchens und Anomalien des Spindelapparates sowie in Verbindung mit Veränderungen in der Zellzyklusregulation zu anormaler Chromosomenverteilung bzw. -trennung in Verbindung gebracht werden.

Es wurden zahlreiche Transkripte der GO Mitochondrium, Zellatmung, darunter vor allem viele ATP-Synthasen kodierende mRNA signalreduziert vorgefunden. Diese Transkriptänderungen könnten im Zusammenhang stehen zu der in gealterten Eiern beobachteten Anschwellung der mitochondrialen Matrix sowie einem Abfall des Membranpotenzials (siehe Übersichtsartikel Tarín *et al.*, 2000; Fissore et al., 2002 und Miao *et al.*, 2009). Veränderte Prozesse entlang der Elektronentransportkette könnten die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) begünstigen, die als ein Grund der Zellalterung diskutiert werden (Tarín *et al.*, 1996; Li et al., 2012). GO für Apoptose, die in gealterten Eiern postuliert wird (Gordo *et al.*, 2002) wurden nicht gefunden. Dennoch fand ich in Übereinstimmung zur beobachteten Abnahme der BCL2 kodierenden mRNA in gealterten Oozyten von

Schwein (Ma *et al.*, 2005) bzw. Maus (Gordo *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2009) die Signalstärken der bcl2l2 und bcl2l13 mRNA in gealterten Froscheiern um 1,8 bzw. 1,6 fach reduziert vor. Auch steht das Prohibitin 2 Protein, deren mRNA ich in gealterten Eiern signalreduziert fand, im Zusammenhang mit der Bildung von ROS sowie einer erhöhten Apoptosesensitivität (Osman *et al.*, 2009). Veränderungen in der Morphologie, die auf eine Apoptose hinweisen, konnte ich einer 3 h gealterten Eizelle nicht beobachten. Eine Abnahme dieser polyadenylierten mRNA mag aber mit den apoptotischen Vorgängen, die ich in 5 - 12 h alten Froscheizellen beobachtete, zusammenhängen.

Interessanterweise waren die biologischen Prozesse Zellatmung und Glukosestoffwechsel sowie das Zellkompartiment protontransportierender ATP-Synthasekomplex nicht nur stark angereichert, sondern ausschließlich in signalreduzierten Sondensätzen vorzufinden (Tab. A2). Zwei unabhängige GO EAST Analysen von je 1000 als nicht verändert gemessenen Sondensätzen beinhalteten diese GO nicht, während ein großer Teil der in den signalreduzierten Sondensätzen angereicherten GO auch in nicht signalveränderten Sondensätzen vorzufinden war (Tab. A2). Störungen im Glucosemetabolismus können die Entwicklungskompetenz von Oozyten erheblich beeinflussen (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). Eine Beeinträchtigung des Glucosestoffwechsels sowie der Zellatmung kann zu einer reduzierten ATP Synthese in gealterten Zellen führen. Ein reduzierter ATP Gehalt mag ATP-abhängige Calciumpumpen negativ beeinflussen, welche die Calciumoszillation und somit die Eiaktivierung nach Spermieintritt steuern. Tatsächlich wurde gezeigt, dass gealterte Schweineoozyten weniger ATP enthalten (Hao *et al.*, 2009), im Karpfen die Abnahme der ATP-Konzentration während der Eialterung mit einer Zunahme der Embryonenmortalität korreliert (Boulekbache *et al.*, 1988) und dass gealterte Mausoozyten das in den ersten Calciumoszillationen verbrauchte ATP nicht rechtzeitig wieder herstellen können (Igarashi *et al.*, 2005).

Unter den signalreduzierten Transkripten waren vorwiegend durch Haushaltsgene kodierte mRNA anzutreffen (Tab. A1 und A2). Da diese in unreifen Oozyten zum raschen Wachstum benötigt werden, werden sie in hoher Anzahl exprimiert. Mit der Wiederaufnahme der Meiose werden diese deadenyliert. So finden sich in den während der Eireifung deadenylierten Transkripten, die Graindorge *et al.* in *X. tropicalis* bestimmt hatten, ebenfalls vorwiegend durch Haushaltsgene kodierte mRNA vor. Auch in der Maus wurde die Deadenylierung von durch Haushaltsgene

kodierte mRNA während der Eireifung gefunden (Bachvarova *et al.*, 1985, Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999). Dies spricht dafür, dass viele durch Haushaltsgene kodierte mRNA, die ich in gealterten Froscheiern signalvermindert fand, höchstwahrscheinlich solche sind, deren Deadenylierung während der Eireifung begann und sich während der Alterung fortsetzt, anstatt dass die Alterung an sich eine Deadenylierung dieser mRNA initiiert. Zu diesen Transkripten dürften z.B. die in gealterten *Xenopus* Eizellen signalreduziert vorliegenden Lactat Dehydrogenase b und Zona pellucida Proteine zp3.2 und zp.4 kodierenden mRNA zählen, die in Mausoozyten während der Eireifung deadenyliert werden (siehe Übersichtsartikel Eichenlaub-Ritter und Peschke, 2002). Es wurde beobachtet, dass durch Haushaltsgene kodierte, während der Reifung von Rinderoozyten deadenylierte Transkripte in Oozyten geringer Qualität kürzere PolyA besaßen als in Oozyten hoher Qualität (Brevini-Gandolfi *et al.*, 1999). Dies unterstützt meine These, dass die in dieser Arbeit postulierte Fortsetzung der Transkriptdeadenylierung während der Alterung mit dem Potenzialverlust postovulatorisch alternder Eizellen zusammenhängt.

4.6 Ein ovuliertes Ei reift weiter

Diese Arbeit zeigt, dass die während der Alterung beobachtete Reduzierung der Menge polyadenylierter mRNA ein breit wirkender Prozess ist. Auch scheint dieser einheitlich reguliert zu sein. Denn es fällt auf, dass die Abnahme der Transkriptsignale zwischen den einzelnen Froschweibchen zwar deutlich in ihrer Stärke variierte, innerhalb einer Eiablage dagegen recht einheitlich verlief (Abb. 11). Mit anderen Worten, war die Menge polyadenylierter mRNA nur schwach (Abb. 11, Tier 5 und 7) bzw. stark (Abb. 11, Tier 4) verändert, so galt diese Änderung für alle 14 Transkripte in ähnlicher Intensität. Diese Feststellung sowie die Tatsache, dass zahlreiche Transkripte betroffen sind, steht in Übereinstimmung mit der Eigenschaft der translationalen Kontrolle an sich, die anstatt wenige einzelne mRNA zu beeinflussen als ein breit wirkender Mechanismus der Proteinexpressionsregulierung fungiert (Pradet-Balade *et al.*, 2001).

Da die Translation hauptsächlich durch in der 3'NTR liegende cis-Elemente reguliert wird, charakterisierte ich die 3'NTR aller im Array als signalverändert bzw. nicht signalverändert gemessenen Transkripte. Mir fiel auf, dass am stärksten signalreduzierte Transkripte deutlich kurze 3'NTR besaßen und ich fand eine

signifikant inverse Korrelation zwischen der Änderung der Signalstärke und der 3'NTR-Länge (Abb. 19). Interessanterweise werden Transkripte mit kurzer 3'NTR stärker exprimiert (Andreassi und Riccio, 2009) und reagieren sensibler auf Änderung der PolyA-Länge (Tanguay und Gallie, 1996; Ledda *et al.*, 2005). Die Feststellung, dass stark reduzierte Transkripte kurze 3'NTR besitzen, deckt sich mit der Beobachtung, dass diese durch Haushaltsgene kodiert sind. Da durch Haushaltsgene kodierte Transkripte meist beständig in großer Zahl benötigt werden, ist es auf evolutionärer Ebene von Vorteil, eine kurze NTR zu besitzen, die wenig Energie zu ihrer Synthese benötigt (De Ferrari und Aitken, 2006). Die Translation regulatorischer Proteine ist dagegen auf ein spezifisches Zeitfenster bestimmt, weshalb oft mehrere regulatorische Elemente und somit längere NTR in den entsprechenden Transkripten essentiell sind. Dies warf die Frage auf, ob signalreduzierte Transkripte an regulatorischen Elementen unterrepräsentiert sind.

Das MBE und die TCS regulieren Transkripte, die kurz nach der Progesteronstimulierung aktiviert und als früh polyadenyliert bezeichnet werden. Deren Produkte aktivieren die späte Polyadenylierung, wodurch eine korrekte Folge des Zellzyklusfortgangs gesichert wird. So ist die frühe MBE vermittelte mRNA Translationsaktivierung eine Voraussetzung für die daraufhin folgende CPE abhängige Translation. Die frühe Polyadenylierung wird dabei nicht durch das CPE induziert (Diese Zusammenhänge sind beschrieben in Charlesworth *et al.*, 2004 und 2006; Arumugam *et al.*, 2010; MacNicol und MacNicol, 2010).

Transkripte, die ein CPE enthalten, werden in unreifen Oozyten translationsreprimiert. Das CPE bindende Protein (CPEB) rekrutiert dabei die PARN Deadenylase, die einer Polyadenylierung durch die Polymerase GLD-2 entgegenwirkt, sowie weitere reprimierende Faktoren wie z.B. Maskin und Pumillo, die die Bildung des aktiven Translationsinitiationskomplexes inhibieren. Erst mit dem GVBD kommt es zur Phosphorylierung des CPEB, die zur Dissoziation der translationsreprimierenden Proteine führt. Hierdurch wird das PolyA verlängert, an das PolyA bindende Proteine (PABP) binden. Über Wechselwirkungen dieser mit cap bindenden Proteinen wird die Translation aktiviert (Diese Zusammenhänge sind beschrieben in Radford *et al.*, 2008; Richter, 2008; Brook *et al.*, 2009). Es ist interessant, dass ich die frühe Polyadenylierung regulierende MBE und TCS in allen Transkripten etwa gleich häufig fand, wohingegen die späte Polyadenylierung regulierende CPE in stark signalreduzierten Transkripten im Vergleich zu schwach

signalreduzierten sowie zu signalerhöhten mRNA signifikant unterrepräsentiert war (Abb. 20). Das CPE kann Polyadenylierung nur bewirken, wenn in seiner Nähe das kanonische PAS ebenfalls vorhanden ist (Pique et al., 2008). Es ist bekannt, dass nicht kanonische PAS die Polyadenylierung anders als das kanonische PAS AAUAA beeinflussen (Beaudoing et al., 2000; Chatterjee und Pal, 2009). Daher ist es nicht verwunderlich, dass das AAUAAA aber nicht die nicht-kanonischen PAS in reduzierten Transkripten signifikant unterrepräsentiert war(en) (Abb. 20).

Die Vermutung, die Deadenylierung könnte durch das ARE induziert sein, wurde nicht bestätigt. Obwohl dieses Element die mRNA Translation gerade in den letzten Stadien der Eireifung beeinflusst (Belloc und Mendez, 2008), fand ich keine Anreicherung dieses Elements (Abb. 21). Eine Gleichverteilung von ARE passt insofern ins Gesamtbild, als es die Deadenylierung von Transkripten steuert, die zuvor über andere regulatorische Elemente, z.B. MBE oder CPE, polyadenyliert werden (MacNicol und MacNicol, 2010). Während der Eireifung polyadenylierte Transkripte sind aber in den während der Eialterung reduzierten Transkripten kaum vertreten (Abb. 22). Eine Ungleichverteilung des EDEN, das im Embryo die Deadenylierung maternaler Transkripte vermittelt (Paillard et al., 1998), fand ich in gealterten Zellen nicht vor.

Die vorliegende Verteilung der regulatorischen Elemente zeigt, dass Transkripte, deren Menge polyadenylierter mRNA in alternden Eiern abnimmt, überproportional solche sind, denen ein CPE fehlt. Transkripte, die kein CPE enthalten, werden typischerweise in einer unreifen Eizelle aktiv translatiert und während der Eireifung deadenyliert. Die Translationsinaktivierung bedarf dabei keiner cis-Elemente sondern gilt für alle mRNA, denen ein CPE fehlt (Fox und Wickens, 1990; Varnum und Wormington, 1990). Dies legt nahe, dass es sich bei den während der Alterung signalreduzierten Transkripten um solche handelt, die während der Eireifung bereits deadenyliert werden. Typisch für die Deadenylierung reifender Oozyten ist zudem, dass der gesamte PolyA entfernt wird, wie ich es in den während der Alterung deadenylierten Transkripten beobachtete (Abb. 15B). Dagegen wird die CPE abhängige Deadenylierung, die vor dem GVBD erfolgt, gestoppt, sobald das PolyA eine Länge von 30 - 40 nt erreicht hat, was durch bindende PABP bedingt sein mag (Huarte et al., 1992; Vassali und Stutz, 1995).

Ein Vergleich der im Array bestimmten Transkripte mit den von Graindorge nach ihrem Adenylierungsverhalten charakterisierten Transkripten bestätigte die obige

Vermutung. Die während der Eireifung deadenylierten Transkripte waren an während der Eialterung signalverminderten Transkripten signifikant überproportional vertreten (Abb. 22, Kategorie 1, 6 und 8). Die Schlussfolgerung, dass es sich hier um eine Weiterreifung der Zelle handelt, wird zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass eine alternde Eizelle eine ähnliche Dynamik im Adenylierungsverhalten aufzeigt, wie eine Eizelle während der letzten Reifungsphase: So beschreibt Graindorge *et al.* in *X. tropicalis*, dass zwischen einer ausgewachsenen unreifen Oozyte (Stadium VI) und der gelaichten unbefruchteten Eizelle 436 von insgesamt 2089 untersuchten Spondensätzen signalverändert waren. Davon waren 294 Spondensätze signalvermindert und 142 -erhöht, was 14,1 bzw. 6,8 % der gemessenen Spondensätze entspricht. Es ist interessant, dass ich in gealterten Eiern ebenfalls 14 % der gemessenen Spondensätze signalvermindert fand. Dass ich in gealterten Eizellen dagegen nur wenige signalverstärkte Spondensätze beobachtete, mag an der Messmethodik liegen. Für die Microarray Analyse wird die mRNA mit *anchored* Oligo(dT)₂₀ Primern in cRNA umgeschrieben. Diese Methode erlaubt nicht zu unterscheiden, ob eine bereits während der Eireifung deutlich polyadenylierte mRNA weiter polyadenyliert wird. Dies ist der gleiche Grund, wieso Graindorge *et al.* in deren Microarray-Analyse keine Transkripte der Kategorie 7 zuordnen konnten, nämlich solche, die während Eireifung und nach der Befruchtung polyadenyliert werden (Graindorge *et al.*, 2006).

Dieser Fortgang reifungsspezifischer Deadenylierung erklärt somit sowohl die hohe Anzahl veränderter Transkripte, ihre Zugehörigkeit zu einer großen Bandbreite biologischer Prozesse als auch die Beobachtung, dass die signalreduzierten Transkripten kurze 3'NTR besitzen und Haushaltsgenen zugehören. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass die reifungsspezifische Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA während der Alterung weiterläuft und die Eizelle die für die Eireifung typische hohe Dynamik beibehält. Sie bestätigt, dass Pflüger vor mehr als 100 Jahren Recht hatte, als er die postovulatorisch gealterte Eizelle als - im wahrsten Sinne des Wortes - "überreif" beschrieb (Pflüger, 1882).

4.7 Gealterte Eizellen zeigen Prozesse, die sonst erst nach der Befruchtung erfolgen

Der Vergleich der während der Alterung signalreduzierten Transkripte mit den durch Graindorge bestimmten Transkriptkategorien offenbarte nicht nur, dass nach der Ovulation die Zelle weiterreift, sondern zeigte auch, dass Transkripte, die während der Eireifung keine Veränderungen erfahren und erst nach der Befruchtung deadenylieren, in gealterten Eiern signifikant überproportional oft signalvermindert waren (Abb. 22, Kategorie 5). Das bedeutet, in einer alternden Eizelle erfolgen Prozesse, die sonst erst nach der Befruchtung beschrieben werden. So fand ich zahlreiche Transkripte, die in DNA Reparatur involvierte Proteine kodieren, wie *xrcc3*, *alkbh1*, *pcna*, *mcm4*, *mcm2*, *cdc91l1*, *cks1b* und *cdc37*, in gealterten Eizellen signalreduziert vor, obwohl diese in der Maus erst während des Überganges zwischen der Oozyte zum 2-Zell Embryo als signalvermindert beschrieben wurden (Hamatani *et al.*, 2008).

Bisher ist die Deadenylierung von normalerweise erst nach der Befruchtung deadenylierten mRNA in gealterten Zellen nicht beschrieben worden. Es wurde jedoch die "Vorwegnahme" von Prozessen, die sonst erst nach Eibefruchtung stattfinden, in gealterten Eizellen auf biochemischer sowie zellbiologischer Ebene gefunden. In 36 h gealterten Mausoozyten z.B. war die maternale Actin mRNA nicht mehr detektierbar, obwohl diese normalerweise erst im 2-Zellstadium gänzlich degradiert wird (Paynton *et al.*, 1988). Proteine, die sonst erst nach der Befruchtung synthetisiert werden, sind in alternden Oozyten nachweisbar. Teilweise erfolgt die Proteinsynthese in gealterten Eiern zum gleichen postovulatorischen Zeitpunkt, zu dem sie sonst in befruchteten Eizellen detektierbar ist (Van Blerkom, 1983; Howlett und Bolton, 1985; Xu *et al.*, 1997). Normalerweise führt erst die Bindung eines Spermiums an die Eizelle zu ihrer Aktivierung, die sich im wellenartigen Freisetzen von Calcium aus dem ER äußert (Runft *et al.*, 2002). Diese Calciumausschüttung führt erstens durch das Entlassen von kortikalen Granula aus dem Eicortex zur Verhärtung der Zona pellucida und somit zum Polyspermieblock. Zweitens werden hierdurch die Aktivitäten des MPF und der MAP-Kinase reduziert und der Metaphase2 Arrest aufgehoben. Gealterte Mausoozyten dagegen zeigten ein Entlassen der kortikalen Granula ohne vorherigen Spermienkontakt (Ducibella *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1997; Wortzman und Evans, 2004). So besaßen 10 h gealterte Mausoozyten eine um 40 % geringere Dichte an kortikalen Granula als frische

Oozyten. 1,5 bzw. 4 h nach der Befruchtung war die Dichte der kortikalen Granula in frischen und gealterten Oozyten jedoch wieder annähernd gleich (Wortzman und Evans, 2004). Ebenfalls war eine Vergrößerung des Perivitellin-Raumes sowie das vorzeitige Aushärten der Zona pellucida (Longo, 1981; Xu *et al.*, 1997) in Maus gemessen worden. D.h. in gealterten Zellen verläuft die Cortexreaktion vorzeitig jedoch partiell bzw. bedeutend langsamer ab als nach der Eiaktivierung. Ähnliches gilt auch für die partielle Abnahme der MPF und MAP-Kinase Aktivitäten. In frischen, befruchteten Eiern sinkt die MPF Aktivität 3 - 5 h nach Eiaktivierung auf ca. 5 %, die MAP Kinase Aktivität 7 h nach Eiaktivierung auf ca. 5 - 10 % ihrer Aktivität im Metaphase II Stadiums. In unbesamten Eizellen dagegen sanken die MPF sowie MAP-Kinase Aktivitäten nach 4 h Alterung um ca. 25 % bzw. nach 10 h auf 50 % im Vergleich zu frischen Eizellen (Xu *et al.*, 1997). Dieser vorzeitige Eintritt in die Anaphase steht auch im Einklang mit der Beobachtung vorzeitiger Chromosomentrennung sowie Chromosomendekondensation (Dailey *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1997; Mailhes *et al.*, 1998). Auch wurde die Bildung von Mikrotubuliastern, die normalerweise 6 - 12 h nach der Penetration durch ein Spermium erfolgt, in 12 h gealterten, befruchtbaren Mausoozyten beobachtet, jedoch nicht mehr in 24 h gealterten, nicht mehr befruchtbaren (Eichenlaub-Ritter *et al.*, 1986). Das vorzeitige Auftreten von Mikrotubuliastern ist auch in 5 h gealterten befruchtbaren Kaninchenoozyten beschrieben (Adenot *et al.*, 1997).

Diese "Vorwegnahme" von Prozessen mag dazu beitragen, dass gealterte Eizellen eine erhöhte spontane Aktivierung besitzen (Yang *et al.*, 1994; Adenot *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997), und dass Vorgänge des ersten Zellzyklus in verzögert befruchteten Eizellen schneller verlaufen. Man besamte frische und 7 h gealterte Mausoozyten mit demselben Spermienaliquot gleichzeitig und fand, dass in gealterten Oozyten der erste Zellzyklus um 2 h verkürzt war (Shalgi *et al.*, 1985). 12 h gealterte Mausoozyten besaßen ein um 1,5 h kürzeres Zeitintervall zwischen Besamung und Spermienpenetration, die Bildung der Pronuklei in gealterten Zellen verlief etwas schneller und die Zeitspanne zwischen Pronukleibildung und Zerfall der Pronukleimembran war um 1 h bzw. die Dauer der ersten Zellteilung um 3 h beschleunigt (Boerjan und De Boer, 1990). In 13 h gealterten Mausoozyten fand man ebenfalls, dass die Pronukleibildung 4 h früher stattfand (Lacham-Kaplan und Trounson, 2008). Diese beschleunigten Kernprozesse wurden ebenfalls in gealterten Rinderoozyten beschrieben (Presicce und Yang, 1994).

Meine Schlussfolgerung, dass spezifische signalverminderte Transkripte, die normal erst nach der Befruchtung deadenyliert werden, bereits in alternden *Xenopuseizellen* deadenyliert werden, steht somit zu den obigen Beispielen in Übereinstimmung. Auch das postovulatorische Fortlaufen der Eireifung mag erklären, wieso manche Prozesse verfrüht beobachtet werden. Man muss sich bewusst machen, dass Transkripte durch Graindorge *et al.* danach kategorisiert wurden, ob diese zwischen der unreifen Oozyte und dem unbefruchteten ovulierten Ei bzw. zwischen dem ovulierten Ei und dem 64-Zell Embryo ihr PolyA änderten. Man weiß dabei nicht, ob die in Kategorie 5 eingeordneten Transkripte erst durch die Befruchtung *per se* deadenyliert werden. Man kann lediglich festhalten, dass in diesem Zeitfenster eine Deadenylierung erfolgt. Folglich kann man im alternden *Xenopusei* den Prozess der Weiterreifung (Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA der Kategorien 1, 6 und 8) und die "Vorwegnahme" von Prozessen (Abnahme der Menge polyadenylierter mRNA der Kategorie 5) als ein Kontinuum zusammenfassen, das abläuft, ob eine Befruchtung nun stattfindet oder nicht. Bachvarova stellte einst die Frage, ob Veränderungen in der mRNA in den ersten 1,5 Tagen der Mausembryogenese eigentlich in den letzten 12 h der Eireifung beginnen (Bachvarova *et al.*, 1985). Ähnlich vermutete Shalgi, dass Entwicklungsprozesse der Zygote bereits vor der Befruchtung in der Oozyte erfolgen, jedoch wesentlich langsamer, als nach der Befruchtung (Shalgi *et al.*, 1985). Und Howlett und Bolton postulierten, dass viele der Proteinveränderungen während der Eiaktivierung die letzten Prozesse der Eireifung widerspiegeln (Howlett und Bolton, 1985). Van Blerkom vermutete, dass die Synthese mancher Proteine in der ersten Zeit nach der Befruchtung über ein intrinsisches Entwicklungsprogramm reguliert wird, welches während der Eireifung beginnt und unabhängig von der Befruchtung erfolgt (Van Blerkom, 1981). Howlett und Bolton beschrieben daraufhin, dass in einer befruchteten Eizelle zwei Programme parallel verlaufen. Das Befruchtungsprogramm ist befruchtungsabhängig, d.h. wird erst durch die Befruchtung in Gang gesetzt. Das Oozytenprogramm ist per Definition befruchtungsunabhängig, d.h. läuft ohne dass die Oozyte besamt werden muss, kann jedoch durch die Befruchtung beschleunigt werden. Dieses Modell wird in dieser Arbeit erstmals auf globaler mRNA Ebene bestätigt.

Diesem Modell zufolge würden in einer alternden Eizelle nicht Prozesse "vorweggenommen" werden, sie liefen ja als Oozytenprogramm weiter, sondern die

Befruchtung an sich wäre dann - im wahrsten Sinne des Wortes - verzögert. Das wirft das Problem auf, dass Prozesse, die erst durch die Befruchtung in Gang gesetzt werden (Befruchtungsprogramm) auf ein nicht ideales Umfeld treffen. Das hieße durch die verzögerte Befruchtung können die oozytenabhängigen und die befruchtungsabhängigen Prozesse nicht mehr Hand in Hand gehen, das eine Zahnrad nicht in das andere greifen.

Meine Ergebnisse sprechen dafür, dass der Vorgang der postovulatorischen Alterung kein Programm ist, das plötzlich neu gestartet wird, sondern dass es sich wahrscheinlich um die Folge eines Ungleichgewichtes zwischen einzelnen weiterlaufenden und noch nicht begonnenen Prozessen handelt. Dieses Ungleichgewicht mag zum progressiven Potenzialverlust der Eizelle führen. Durch das Weiterlaufen des Oozytenprogrammes mögen zwar einzelne Vorgänge nach der Befruchtung beschleunigt sein (kürzere 1. Teilung), jedoch teile ich nicht die Vermutung von Eichenlaub-Ritter, dass vorzeitige Änderungen in der Oozyte dieser erlauben den normalen Entwicklungszeitplan wieder aufzuholen (Eichenlaub-Ritter et al., 1986). Ich denke eher, dass die Desynchronisation der einzelnen Entwicklungsprozesse die Eizelle hindert, sich normal zu entwickeln und stattdessen eine fehlerhafte sowie verzögerte Entwicklung unterstützt.

4.8 Postovulatorische Alterung beim Menschen

In dieser Arbeit wurde die postovulatorische Alterung untersucht, indem die Befruchtung künstlich verzögert wurde. Eine verspätete Befruchtung würde beim Krallenfrosch in der Natur eher nicht zu erwarten sein, da das Männchen beständig auf dem Weibchen sitzt und sie erst durch die Umklammerung zur Ovulation bzw. zum Laichen stimuliert. Er muss die gelaichten Eier sofort besamen, da das Aufquellen der Gallerthülle in Wasser eine verspätete Befruchtung verhindern würde. Diesen Schutzmechanismus der Natur, der das Treffen von frischen Gameten aufeinander garantiert, findet man in vielen Vertebraten wieder. Meist wird entweder die Ovulation direkt als Antwort auf die Kopulation oder durch bestimmte Temperatur- bzw. Paarungszeiten induziert oder es werden zum Zeitpunkt der Empfängnisbereitschaft Lockstoffe ausgesondert, die zur Paarung führen. Dadurch wird sichergestellt, dass Eisprung und Besamung zeitnah erfolgen.

Beim Menschen sind die obigen Schutzmechanismen unbekannt. Zeitpunkt des menschlichen Paarungsverhaltens und des Eisprungs sind nicht aufeinander abgestimmt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass gealterte Eizellen befruchtet werden. So wurden beim Menschen mehrere Studien beschrieben, in denen das Risiko einer postovulatorischen Eialterung über den Zeitpunkt der Empfängnis im Verhältnis zum Zeitpunkt des Eisprungs abgeleitet wurde. Der Tag der Ovulation wurde bestimmt über Änderungen im Zervixschleim und der Basaltemperatur (Guerrero und Rojas, 1975; Gray *et al.*, 1995) bzw. über Östrogen- und Progesteronmetaboliten im Urin (Wilcox *et al.*, 1998). Guerrero und Rojas berichteten, dass das Risiko eines spontanen Abortes deutlich erhöht war, wenn die Besamung 3 Tage nach dem Anstieg der Basaltemperatur erfolgte im Vergleich, wenn sie kurz vor dem Anstieg stattfand. Gray fand bei Frauen, die in der Vergangenheit bereits einen Fruchttod erlitten, dass das Abort-Risiko niedriger war, wenn die Empfängnis am Tag vor oder am gleichen Tag wie die Ovulation stattfand. (Gray *et al.*, 1995). Ebenso berichtete Wilcox, dass das Risiko eines frühen Spontanabortes erhöht ist mit der Wahrscheinlichkeit einer verzögerten Befruchtung (Wilcox *et al.*, 1998).

Die Relevanz der Eialterung findet jedoch vor allem dort ihr Gewicht, wo gezielt in den Reproduktionsprozess eingegriffen wird. Die Thematik der verzögerten Befruchtung erhält heute ihre Aktualität vor allem durch die zunehmende Anwendung der Assistierten Reproduktionstechnologien (ART). Seit das erste Retortenbaby 1978 geboren wurde sind bis heute mehr als vier Millionen Kinder über ART gezeugt worden (Dondorp und De Wert, 2011). Dem letzten ESHRE Bericht zufolge kommen in Europa zwischen 0,5 - 5 % aller Kinder dank ART zur Welt. Die Anzahl der künstlichen Befruchtung stieg dabei allein zwischen 2006 und 2007 um 7,8 % auf fast eine halbe Million Zyklen pro Jahr (De Mouzon *et al.*, 2012). Die Häufigkeit der ART Anwendungen wird in Zukunft weiterhin steigen, da einzelne Umweltfaktoren sowie die veränderte Lebensführung mit einem immer höheren Zeugungsalter zu abnehmender Fruchtbarkeit führen. Bereits heute gelten 10 % aller Paare als infertil (Evans und Florman, 2002). Die Problematik der ART liegt vor allem im niedrigen Erfolg ein Kind zu gebären. Pro In-vitro-Befruchtung (*in vitro fertilization*, IVF) bzw. Intracytoplasmatische Spermieninjektion (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) Zyklus kommt es nur in ca. 30 % zu einer klinischen Schwangerschaft und nur in ca. 10 % zu einer erfolgreichen Austragung (De Mouzon *et al.*, 2012). Zu den in ART

Schwangerschaften erhöhten Hauptrisiken gehören die Früh-, Fehl- und Totgeburt, sowie ein geringes Gestations- bzw. Geburtsgewicht (Halliday 2006; McDonald *et al.*, 2009; Wisborg *et al.*, 2010). Zusätzlich besteht für Kinder, die durch ART gezeugt wurden ein 30 - 40 % erhöhtes Risiko für angeborene Anomalien (Hansen *et al.*, 2005). Als Grund hierfür werden neben den eigentlichen Ursachen für die Infertilität des Elternpaares (Romundstad *et al.*, 2008) vor allem die Technik der künstlichen Befruchtung an sich angesehen, die die Eizellenqualität negativ beeinflusst. Ein wichtiger Punkt ist hier unter anderem die Problematik die gewonnene Eizelle zeitnah zu befruchten. Oft hat der Vater zum Zeitpunkt der Oozytenpunktion noch keinen Samen bereitgestellt oder dieser muss noch aufbereitet werden. Für ICSI muss die Eizelle selbst zusätzlich z.B. durch Entfernen der Cumuluszellen vorbereitet werden. Diese Faktoren verzögern alle die Befruchtung des Eies.

Die Alterung der Eizelle durch eine verspätete Befruchtung mag ein unterschätzter Grund für die negativen Effekte der ART sein. Denn obwohl es evident ist, dass die Verwendung frisch punktierter MII Oozyten optimal ist um gesunde Embryonen zu erhalten, wird in vielen Kliniken der Zeitpunkt der Eizellenbefruchtung allein durch das anfallende Arbeitspensum bestimmt, so dass Oozyten zwischen 0,5 und 8 h nach Eizellenerhalt befruchtet werden (Jacobs *et al.*, 2001). Weiterhin verwenden weltweit IVF Kliniken Oozyten, deren *in vitro* Besamung fehlschlug, erneut für ICSI. Obwohl retrospektive Studien die Beobachtung aus Tierversuchen bestätigen, dass das Risiko für anormale Entwicklung mit zunehmender Alterung des menschlichen Eies steigt (Gullett *et al.*, 1998; Kuczyński *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2011), werden bei dem Rettungs-ICSI bis zu 2 Tage alte MII Oozyten benutzt und in Patienten transferiert. Die Befruchtungsrate liegt je nach Klinik bis zu 60 % (Yuzpe *et al.*, 2000) und es werden zwischen keinen etablierten (Park *et al.*, 2000; Kably Ambe *et al.*, 2002; Kuczyński *et al.*, 2002) bis zu erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaften (Lundin *et al.*, 1996; Bussen *et al.*, 1997; Yuzpe *et al.*, 2000; Lombardi *et al.*, 2003; Amarín *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010 b; Shalom-Paz *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012) berichtet.

Kuczyński *et al.* zeigten, dass einen Tag gealterte Oozyten sich zu 4-Zell Embryonen geringerer Qualität entwickelten, obwohl sie noch gut befruchtbar und morphologisch unauffällig waren. Dies stimmt mit meinen Beobachtungen überein. Zusätzlich entwickelten sich Embryonen aus wiederbesamten, gealterten Oozyten deutlich langsamer (Kuczyński *et al.*, 2000). Dies ist insofern besonders interessant, als

neben erhöhter Mortalität das verzögerte Wachstum der *Xenopus*larven aus gealterten Eiern die am häufigsten von mir beobachtete bzw. in verschiedenen Weibchen einzig uniform anomale Entwicklung war. Da die von mir festgestellten rapiden Änderungen einer alternden Eizelle auch für den Menschen zu erwarten sind, appelliert meine Arbeit diese bisher unbekannte hohe Dynamik einer alternden Zelle nicht zu unterschätzen. Denn die gute Befruchtbarkeit gealterter Oozyten mag den Trugschluss erwecken, die Entwicklungskompetenz der gealterten Oozyte sei ebenfalls kaum gemindert. Empfehlungen gealterte Oozyten für Rettungs-ICSI zu verwenden (Yuzpe *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2010 b; Shalom-Paz *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012) sind daher mit Vorsicht zu begegnen. Die hier gezeigten Änderungen im Transkriptom sowie Potenzial der postovulatorischen Eizelle sollten ebenfalls bei der Verwendung fehlbefruchteter humaner Eizellen zur Herstellung embryonaler Stammzellen (De Sousa *et al.*, 2009; Lieberman *et al.*, 2009) bzw. zum Studium molekularer Vorgänge in Oozyten (Chi *et al.*, 1988) bedacht werden.

Es fällt auf, dass die in dieser Arbeit beobachtete verzögerte Embryonalentwicklung ebenfalls oft nach verzögerter Ovulation, nach Superovulation bzw. nach ART generell auftritt. In Maus sowie Hamster wurde gezeigt, dass die Embryonalentwicklung aus verzögert ovulierten bzw. superovulierten Oozyten retardiert ist. Dies äußerte sich anhand geringerer Zellzahlen, kleineren Trophoblasten, verspäterer Morulabildung bzw. verspätetem Schlüpfen der Blastozyste, geringerem Gewicht der Embryonen sowie bis zu 40 % unterentwickelter Feten (McKiernan und Bavister, 1998; Erztheid und Storeng, 2001; Van der Auwera *et al.*, 2001; Bittner *et al.*, 2011). Dabei zeigten Van der Auwera *et al.* durch das Transferieren von Mausembryonen in pseudoschwangere, nicht Gonadotropin behandelte Weibchen, dass die anomale Entwicklung an der reduzierten Oozytenqualität liegen mag und nicht an einem veränderten uterinen Umfeld. Durch ART gezeugte Feten bzw. Neugeborene sind ebenfalls bis zu 2,6 fach unterentwickelt (Schieve *et al.*, 2002; Halliday, 2006; McDonald *et al.*, 2009). Dies ist insofern kritisch, als ein direkter Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und Erkrankungen im Kindes- bis Erwachsenenalter bekannt ist (Law *et al.*, 1993; Winston und Hardy, 2002).

Der von mir in postovulatorisch gealterten *Xenopus*eiern beobachteter Anstieg diverser, schwerwiegender Missbildungen sowie erhöhter Embryonalsterblichkeit wurde in ähnlicher Weise für die preovulatorische Alterung von Amphibieneiern

beschrieben (Witchi und Laugens, 1963; Mikamo, 1968; Mikamo und Hamaguchi, 1975). Eine erhöhte Sterblichkeit bzw. anomale Entwicklung des Embryos zeigte sich in Säugern in Form einer niedrigeren Implantationsrate sowie eines erhöhten Embryonenresorption- bzw. Abort-Risiko nach verzögerter Ovulation (Bittner *et al.*, 2011), Superovulation (McKiernan und Bavister, 1998; Erzt Heid und Storeng, 2001), verzögerter Befruchtung (Blandau und Jordan, 1941; Guerrero und Rojas, 1975; Gray *et al.*, 1995; Pursley *et al.*, 1998; Wilcox *et al.*, 1998) sowie ART beim Menschen (Hardy, 2001).

Basierend auf der in Kapitel 4.7 diskutierten Theorie der oozytenabhängigen Prozesse stelle ich hier die Frage, ob neben der postovulatorischen auch die preovulatorische Alterung bzw. generell ein Eingreifen in den Reifungs- und Entwicklungsprozess, was ja bei ART stets der Fall ist, eine Desynchronisation oozyten- und befruchtungsabhängiger Prozesse zur Folge haben kann. Denn bei der für IVF bzw. ICSI standardmäßig durchgeführten Superovulation werden mehrere Follikel zur Eireifung angeregt aber am Eisprung gehindert. Als Folge erhält man Oozyten unterschiedlichen Reifungsgrades (Reissmann *et al.*, 2000), von denen ein Teil möglicherweise bereits hätte ovulieren müssen. Das heißt, deren Oozytenprogramm könnte sich bereits in einem postovulatorischen Zustand befinden. Folglich würde selbst eine zeitnahe Befruchtung einer preovulatorisch gealterten Oozyte im Hinblick auf oozytenabhängige Prozesse verspätet sein (Abb. 23).

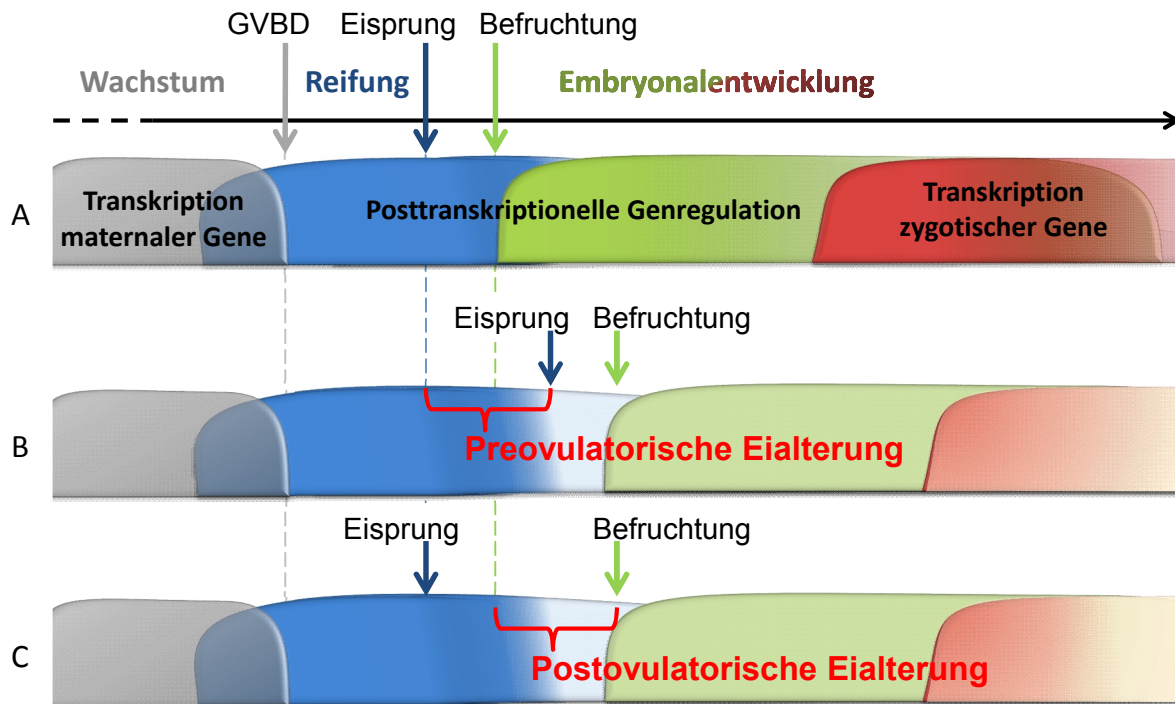


Abb. 23: Vereinfachtes Modell zum Potenzialverlust pre- sowie postovulatorisch gealterter Oozyten.

(A) Normalzustand: Mit Beginn der GVBD (grauer Pfeil) kommt die maternale Gentranskription (graues Feld) zum Erliegen und die Proteinbiosynthese wird vor sowie nach der Ovulation (blauer Pfeil) als auch nach der Befruchtung (grüner Pfeil) über die posttranskriptionelle Kontrolle maternalen mRNA reguliert. Das Oozytenprogramm (blaue Fläche) gewährleistet nicht nur die Befruchtbarkeit der Oozyte sondern auch den Erhalt vieler Haushaltsfunktionen in der frühen postovulatorischen Zeit (Pratt *et al.*, 1983; Howlett und Bolton, 1985). Durch die Aktivierung des Eies durch ein Spermium wird ein befruchtungsabhängiges Programm (grüne Fläche) gestartet, das das Oozytenprogramm beeinflusst bzw. überlagert aber nicht ausschaltet. Vermutlich wechselwirken beide Programme miteinander während der frühen Embryonalentwicklung bis sie während der Aktivierung des embryonalen Genoms durch die Expression embryonaler Gene (rote Fläche) ersetzt werden. (B) Eine verspätete Ovulation bzw. (C) Befruchtung führt zu einer (B) pre- bzw. (C) postovulatorischen Alterung, indem in beiden Fällen das Befruchtungsprogramm zum Oozytenprogramm verspätet eintritt und eine "überreife" Eizelle befruchtet wird. Das resultierende Ungleichgewicht mag nicht nur die frühe Embryonalentwicklung behindern sondern auch die embryonale Genexpression negativ beeinflussen.

Es wäre daher interessant zu sehen, ob die in dieser Arbeit aufgezeigten Änderungen der maternalen mRNA Vorräte einer postovulatorisch alternden Eizelle auch in preovulatorisch gealterten bzw. superovulierten Oozyten vorkommen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Frosch *Xenopus tropicalis* zum Studium der postovulatorischen Alterung erfolgreich etabliert. Obwohl gealterte Eier bis ca. 3 Stunden morphologisch unauffällig und gleich gut befruchtbar blieben, zeigten deren Larven ein hohes Risiko verzögerter Entwicklung sowie diverser Missbildungen. DNA Methylierungsmuster einzelner Genregionen von *cardiac Actin*, *c-Myc* und *Xbra* in Blastula- und Gastrulastadien, die erstmals in *X. tropicalis* mittels Bisulfitsequenzierung analysiert wurden, waren in Embryonen aus frischen sowie gealterten Eizellen gleich. Ein Einfluss der Eialterung auf die DNA Methylierung war somit nicht ersichtlich. Ein Vergleich der Menge maternalen polyadenylierter mRNA in frischen und gealterten Eizellen mittels Microarray deckte zum ersten Mal auf, dass 15% der maternalen Transkripte während der Eialterung verändert werden. Die Signalreduzierung der Transkripte war in mehreren Weibchen reproduzierbar, die alle einen Potenzialverlust der gealterten Eier aufwiesen. Die während der Alterung signalreduzierten Transkripte repräsentierten vorwiegend Haushaltsgene zahlreicher, verschiedener Prozesse. Die mRNA wurden deadenyliert aber nicht degradiert, charakterisierten sich vor allem durch eine kurze 3' nicht translatierte Region (NTR) und waren an dem cytoplasmatischen Polyadenylierungselement (CPE) und dem kanonischen Polyadenylierungssignal AAUAAA unterrepräsentiert. Es ist bekannt, dass Transkripte, denen CPE fehlen, während der Eireifung deadenyliert werden. In Übereinstimmung hierzu waren bekannte während der Eireifung deadenylierte Transkripte an während der Eialterung signalverminderten Transkripten überproportional oft vertreten. Diese Punkte sprechen dafür, dass es sich bei den während der Alterung deadenylierten Transkripten um bereits während der Reifung deadenylierte mRNA handelt. Somit wurde erstmals auf globaler mRNA Ebene die Vermutung von Pflüger aus 1882 bestätigt, dass es sich bei der postovulatorischen Alterung um eine "Überreife" im wahrsten Sinne des Wortes handelt. Transkripte, die sonst in frühen Embryonen deadenyliert werden, lagen in gealterten Eizellen ebenfalls signalvermindert vor. Diese Beobachtung bestätigt das von Howlett und Bolton postulierte Modell oozytenspezifischer Prozesse, die in einer ovulierten Oozyte unabhängig von einer Befruchtung weiterlaufen, erstmals auf globaler mRNA Ebene. Folglich, da zum Zeitpunkt der verzögerten Befruchtung der Haushalt maternaler mRNA stark verändert vorliegt, kommt es zu einer Desynchronisation zwischen den durch die Befruchtung in Gang gesetzter und bereits bestehender Prozesse. Dies mag zum Potentialverlust des alternden Eies beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Adenot,P.G.**, Szöllösi,M.S., Chesné,P., Chastant,S., Renard,J.-P. (1997) In vivo aging of oocytes influences the behavior of nuclei transferred to enucleated rabbit oocytes. *Mol Reprod Dev* 46: 325-336.
- Aegerter,S.**, Jalabert,B., Bobe,J. (2004) Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 67: 127-135.
- Aegerter,S.**, Jalabert,B., Bobe,J. (2005) Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol Reprod Dev* 72: 377-385.
- Amarin,Z.O.**, Obeidat,B.R., Rouzi,A.A., Jallad,M.F., Khader,Y.S. (2005) Intracytoplasmic sperm injection after total conventional in-vitro fertilization failure. *Saudi Med J* 26(3): 411-5.
- Andreassi,C., Riccio,A.** (2009) To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 19(9): 465-74.
- Angell,R.R.** (1991) Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet* 86(4): 383-7.
- Arumugam,K.**, Wang,Y., Hardy,L.L., MacNicol,M.C., MacNicol,A.M. (2010) Enforcing temporal control of maternal mRNA translation during oocyte cell-cycle progression. *EMBO J* 29(2): 387-97.
- Audic,Y.**, Omilli,F., Osborne,H.B. (1998) Embryo deadenylation element-dependent deadenylation is enhanced by a cis element containing AUU repeats. *Mol Cell Biol* 18(12): 6879-84.
- Audic,Y.**, Anderson,C., Bhatti,R., Hartley,R.S. (2001) Zygotic regulation of maternal cyclin A1 and B2 mRNAs. *Mol Cell Biol* 21: 1662-1671.
- Bachvarova,R.**, De Leon,V., Johnson,A., Kaplan,G., Paynton,B.V. (1985) Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 108(2): 325-31.
- Balatsos,N.A.**, Vlachakis,D., Maragozidis,P., Manta,S., Anastasakis,D., Kyritsis,A., Vlassi,M., Komiotis,D., Stathopoulos,C. (2009) Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry* 48(26): 6044-51.
- Beaudoing,E.**, Freier,S., Wyatt,J.R., Claverie,J.M., Gautheret,D. (2000) Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 10: 1001-1010.

- Beaudoing,E., Gautheret,D.** (2001) Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Res* 11(9): 1520-6.
- Beck,C.W., Slack,J.M.** (2001) An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol* 2(10): Reviews1029.
- Belloc,E., Méndez,R.** (2008) A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature* 452(7190): 1017-21.
- Bird,A.** (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1): 6-21.
- Bittner,A.K., Horsthemke,B., Winterhager,E., Grümmer,R.** (2011) Hormone-induced delayed ovulation affects early embryonic development. *Fertil Steril* 95(7): 2390-4.
- Blandau,R.J., Young,W.C.** (1939) The effects of delayed fertilization on the development of the guinea pig ovum. *Amer J Anat* 64: 303-329.
- Blandau,R.J., Jordan,E.S.** (1941) The effect of delayed fertilization on the development of the rat ovum. *Amer J Anat* 64: 275-291.
- Blandau,R.J.** (1954) The effects on development when eggs and sperm are aged before fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 57(5): 526-30.
- Boerjan,M.L., De Boer,P.** (1990) First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Mol Reprod Dev* 25: 155-163.
- Bogdanovic,O., Long,S.W., Van Heeringen,S.J., Brinkman,A.B., Gómez-Skarmeta,J.L., Stunnenberg,H.G., Jones,P.L., Veenstra,G.J.** (2011) Temporal uncoupling of the DNA methylome and transcriptional repression during embryogenesis. *Genome Res* 21(8): 1313-27.
- Bonnet,E., Fostier,A., Bobe,J.** (2007) Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC Genomics* 8: 55.
- Boulekbache,H., Bastin,J., Andriamihaja,M., Lefebvre,B., Joly,C.** (1988) Ageing of fish oocytes: Effects on adenylic nucleotides content, energy charge and viability of carp embryo. *Comp Biochem Physiol* 93B(2): 471-476.
- Bowes,J.B., Snyder,K.A., Segerdell,E., Jarabek,C.J., Azam,K., Zorn,A.M., Vize,P.D.** (2010) Xenbase: gene expression and improved integration. *Nucleic Acids Res* 38: D607-D612.
- Brevini-Gandolfi,T.A., Favetta,L.A., Mauri,L., Luciano,A.M., Cillo,F., Gandolfi,F.** (1999) Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 52(4): 427-33.
- Brook,M., Smith,J.W., Gray,N.K.** (2009) The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* 137: 595-617.
- Bussen,S., Mulfinger,L., Sutterlin,M., Schleyer,M., Kress,W., Steck,T.** (1997) Dizygotic twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of 1 day old unfertilized oocytes. *Human Reproduction* 12(11): 2560-2562.

- Carter,M.,** Hamatani,T., Sharov,A.A., Carmack,C.E., Qian,Y. (2003) In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome Res* 13: 1011-1021.
- Charlesworth,A.,** Cox,L.L., MacNicol,A.M. (2004) Cytoplasmic polyadenylation element (CPE)- and CPE-binding protein (CPEB)-independent mechanisms regulate early class maternal mRNA translational activation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 279: 17650-17659.
- Charlesworth,A.,** Wilczynska,A., Thampi,P., Cox,L.L., MacNicol,A.M. (2006) Musashi regulates the temporal order of mRNA translation during *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* 25: 2792-2801.
- Chason,R.J.,** Csokmay,J., Segars,J.H., DeCherney,A.H., Armant,D.R. (2011) Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab* 22(10): 412-20.
- Chatterjee,S., Pal,J.K.** (2009) Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 101: 251-262.
- Chi,M.M.,** Manchester,J.K., Yang,V.C., Curato,A.D., Strickler,R.C., Lowry,O.H. (1988) Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biol Reprod* 39(2): 295-307.
- Cooke,A.,** Prigge,A., Wickens,M. (2010) Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem* 285: 28506-28513.
- Copeland,P.R., Wormington,M.** (2001) The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA* 7(6): 875-86.
- Dailey,T.,** Dale,B., Cohen,J., Munne,S. (1996) Association between nondisjunction and maternal age in meiosis II human oocytes. *Am J Hum Genet* 59: 176-184.
- De Ferrari,L., Aitken,S.** (2006) Mining housekeeping genes with a Naive Bayes classifier. *BMC Genomics* 7: 277.
- De Mouzon,J.,** Goossens,V., Bhattacharya,S., Castilla,J.A., Ferraretti,A.P., Korsak,V., Kupka,M., Nygren,K.G., Andersen,A.N.; European IVF-Monitoring (EIM); Consortium for the European Society on Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (2012) Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 27(4): 954-66.
- De Sousa,P.A.,** Gardner,J., Sneddon,S., Pells,S., Tye,B.J., Dand,P., Collins,D.M., Stewart,K., Shaw,L., Przyborski,S., Cooke,M., McLaughlin,K.J., Kimber,S.J.,
- Diaz,H., Esponda,P.** (2004 a) Postovulatory ageing induces structural changes in the mouse zona pellucida. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36(2): 211-7.
- Diaz,H., Esponda,P.** (2004 b) Ageing-induces changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* 12(2): 95-103.

- Dondorp,W., De Wert,G.** (2011) Innovative reproductive technologies: risks and responsibilities. *Human Reproduction* 26(7): 1604-1608.
- Dorak,M.T.** (2006) Real-time PCR. London, New York: Verlag Taylor & Francis, S. 46-50.
- Ducibella,T., Duffy,P., Reindollar,R., Su,B.** (1990) Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging in vivo. *Biol Reprod* 43: 870-876.
- Eichenlaub-Ritter,U., Chandley,A.C., Gosden,R.G.** (1986) Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. *Chromosoma* 94: 337-345.
- Eichenlaub-Ritter,U., Stahl,A., Luciani,J.M.** (1988) The microtubular cytoskeleton and chromosomes of unfertilized human oocytes aged in vitro. *Hum Genet* 80(3): 259-64.
- Eichenlaub-Ritter,U., Peschke,M.** (2002) Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update* 8(1): 21-41.
- Ertzeid,G., Storeng,R.** (2001) The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod* 16(2): 221-5.
- Evans,J.P., Florman,H.M.** (2002) The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol.* 4 Suppl: s57-63.
- Evsikov,A.V., Graber,J.H., Brockman,J.M., Hampl,A., Holbrook,A.E., Singh,P., Eppig,J.J., Solter,D., Knowles,B.B.** (2006) Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes Dev* 20(19): 2713-27.
- Evsikov,A.V., De Evsikova,C.M.** (2009) Gene expression during the oocyte-to-embryo transition in mammals. *Mol Reprod Dev* 76: 805-818.
- Fissore,R.A., Kurokawa,M., Knott,J., Zhang,M., Smyth,J.** (2002) Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* 124(6): 745-54.
- Fox,C.A., Wickens,M.** (1990) Poly(A) removal during oocyte maturation: a default reaction selectively prevented by specific sequences in the 3' UTR of certain maternal mRNAs. *Genes Dev* 4(12B): 2287-98.
- Gordo,A.C., Rodrigues,P., Kurokawa,M., Jellerette,T., Exley,G.E., Warner,C., Fissore,R.** (2002) Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biol Reprod* 66: 1828–1837.
- Gosden,R., Lee,B.** (2010) Portrait of an oocyte: our obscure origin. *J Clin Invest* 120(4): 973-83.
- Graindorge,A., Thuret,R., Pollet,N., Osborne,H.B., Audic,Y.** (2006) Identification of post-transcriptionally regulated *Xenopus tropicalis* maternal mRNAs by microarray. *Nucleic Acids Res* 34: 986-995.

- Graindorge,A.**, Le,T.O., Thuret,R., Pollet,N., Osborne,H.B., Audic,Y. (2008) Identification of CUG-BP1/EDEN-BP target mRNAs in *Xenopus tropicalis*. Nucleic Acids Res 36: 1861-1870.
- Gray,R.H.**, Simpson,J.L., Kambic,R.T., Queenan,J.T., Mena,P., Perez,A., Barbato,M. (1995) Timing of conception and the risk of spontaneous abortion among pregnancies occurring during the use of natural family planning. Am J Obstet Gynecol 172(5): 1567-72.
- Grondahl,M.L.**, Yding Andersen,C., Bogstad,J., Nielsen,F.C., Meinertz,H., Barup,R. (2010) Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. Hum Reprod 25: 957-968.
- Guerrero,R., Rojas,O.I.** (1975) Spontaneous abortion and aging of human ova and spermatozoa. N Engl J Med 293(12): 573-5.
- Gullett,J.**, Grunert,G.M., Valdes,C.T., Dunn,R.C., Wun,W.A. (1998) Low Blastocyst Formation Rates in Day-2 Fertilized Oocytes. J Assist Reprod Genet 15(10): 594-8.
- Halliday,J.** (2006) Outcomes of IVF conceptions: are they different? Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 21(1): 67-81.
- Hamatani,T.**, Geppino,F., Carter,M.G., Akutsu,H., Stagg,C.A., Sharov,A.A., Dudekula,D.B., Van Buren,V., Ko,M.S. (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. Human Molecular Genetics 13(19): 2263-2278.
- Hamatani,T.**, Yamada,M., Akutsu,H., Kuji,N., Mochimaru,Y., Takano,M., Toyoda,M., Miyado,K., Umezawa,A., Yoshimura,Y. (2008) What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? Reproduction 135: 581-592.
- Hansen,M.**, Bower,C., Milne,E., De Klerk,K.N., Kurinczuk,J.J. (2005) Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review. Hum Reprod 20: 328-338.
- Hao,Z.D.**, Liu,S., Wu,Y., Wan,P.C., Cui,M.S., Chen,H., Zeng,S.M. (2009) Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca(2+) release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during in vitro ageing. Reprod Fertil Dev 21(2): 323-32.
- Hardy,K.**, Spanos,S., Becker,D., Iannelli,P., Winston,R.M.L., Stark,J. (2001) From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. Proc Natl Acad Sci U S A 98(4):1655-60.
- Hausen,P., Riebesell,M.** (1991) The early development of *Xenopus laevis*: An atlas of the histology. Tübingen: Verl. d. Zeitschrift für Naturforschung.
- Heasman,J.** (2006) Patterning the early *Xenopus* embryo. Development 133: 1205-1217.

- Hellsten,U.**, Harland,R.M., Gilchrist,M.J., Hendrix,D., Jurka,J., Kapitonov,V., Ovcharenko,I., Putnam,N.H., Shu,S., Taher,L., Blitz,I.L., Blumberg,B., Dichmann,D.S., Dubchak,I., Amaya,E., Detter,J.C., Fletcher,R., Gerhard,D.S., Goodstein,D., Graves,T., Grigoriev,I.V., Grimwood,J., Kawashima,T., Lindquist,E., Lucas,S.M., Mead,P.E., Mitros,T., Ogino,H., Ohta,Y., Poliakov,A.V., Pollet,N., Robert,J., Salamov,A., Sater,A.K., Schmutz,J., Terry,A., Vize,P.D., Warren,W.C., Wells,D., Wills,A., Wilson,R.K., Zimmerman,L.B., Zorn,A.M., Grainger,R., Grammer,T., Khokha,M.K., Richardson,P.M., Rokhsar,D.S. (2010) The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. Science 328: 633-636.
- Hilken,G.**, Iglauer,F., Richter,H.-P. (1997) Der Krallenfrosch *Xenopus levis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Howlett,S.K., Bolton,V.N.** (1985) Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. J Embryol Exp Morphol 87: 175-206.
- Huang,J.C.**, Yan,L.Y., Lei,Z.L., Miao,Y.L., Shi,L.H., Yang,J.W., Wang,Q., Ouyang,Y.C., Sun,Q.Y., Chen,D.Y. (2007) Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. Biol Reprod 77: 666-670.
- Huarte,J.**, Stutz,A., O'Connell,M.L., Gubler,P., Belin,D., Darrow,A.L., Strickland,S., Vassalli,J.D. (1992) Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation. Cell 69(6): 1021-30.
- Igarashi,H.**, Takahashi,T., Takahashi,E., Tezuka,N., Nakahara,K., Takahashi,K., Kurachi,H. (2005) Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. Biol Reprod 72: 1256–1261.
- Imamura,T.**, Kerjean,A., Heams,T., Kupiec,J.-J., Thenevin,C., Páldi,A. (2005) Dynamic CpG and Non-CpG Methylation of the Peg1/Mest Gene in the Mouse Oocyte and Preimplantation Embryo. J Biol Chem 280(20): 20171-20175.
- Jacobs,M.**, Stolwijk,A.M., Wetzels,A.M.M. (2001) The effect of insemination/injection time on the results of IVF and ICSI. Hum Reprod 16(8): 1708-1713.
- Jiang,G.J.**, Wang,K., Miao,D.Q., Guo,L., Hou,Y., Schatten,H., Sun,Q.Y. (2011) Protein profile changes during porcine oocyte aging and effects of caffeine on protein expression patterns. PLoS One 6(12): e28996.
- Juetten,J., Bavister,B.D.** (1983) The effects of amino acids, cumulus cells, and bovine serum albumin on in vitro fertilization and first cleavage of hamster eggs. J Exp Zool 227: 487–490.
- Kably Ambe,A.**, Baptista Pérez-Avellá,A., Ruiz Anguas,J., Carballo Mondragón,E. (2002) Unexpected failed fertilization in vitro: ICSI reinsemination or ICSI indication for subsequent cycles. Ginecol Obstet Mex 70: 373-8.
- Kikuchi,K.**, Izaike,Y., Noguchi,J., Furukawa,T., Daen,F.P., Naito,K., Toyoda,Y. (1995) Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. J Reprod Fertil 105: 325-330.

- Kikuchi,K.**, Naito,K., Noguchi,J., Shimada,A., Kaneko,H., Yamashita,M., Aoki,F., Tojo,H. Toyoda,Y. (2000) Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 63: 715-722.
- Kim,N.H.**, Moon,S.J., Prather,R.S., Day,B.N. (1996) Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev* 43: 513-518.
- Kosubek,A.**, Klein-Hitpass,L., Rademacher,K., Horsthemke,B., Ryffel,G.U. (2010) Aging of *Xenopus tropicalis* eggs leads to deadenylation of a specific set of maternal mRNAs and loss of developmental potential. *PLoS One* 5(10): e13532.
- Körner,C.G.**, Wormington,M., Muckenthaler,M., Schneider,S., Dehlin,E., Wahle,E. (1998) The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 17: 5427-5437.
- Krisher,R.L.** (2004) The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 82: E14-23.
- Kronja,I.**, Orr-Weaver,T.L. (2011) Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1584): 3638-52.
- Kuczyński,W.**, Pietrewicz,P., Grygoruk,C., Redzko,S., Grochowski,D., Szamatowicz,J., Wasilewski,T., Wołczyński,S., Syrewicz,M., Domitrz,J., Szamatowicz,M. (2000) Reinsemination of oocytes by intracytoplasmic sperm injection after the failure of conventional fertilization. Early embryonal development. *Ginekol Pol* 71(9): 1053-8.
- Kuczyński,W.**, Dhont,M., Grygoruk,C., Pietrewicz,P., Redzko,S., Szamatowicz,M. (2002) Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. *Hum Reprod* 17(9): 2423-7.
- Lacham-Kaplan,O.**, Trounson,A. (2008) Reduced developmental competence of immature, in-vitro matured and postovulatory aged mouse oocytes following IVF and ICSI. *Reprod Biol Endocrinol* 6: 58.
- Law,C.M.**, De Swiet,M., Osmond,C., Fayers,P.M., Barker,D.J., Cruddas,A.M., Fall,C.H. (1993) Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ* 306(6869): 24-7.
- Ledda,M.**, Di Croce,M., Bedini,B., Wannenes,F., Corvaro,M., Boyd,P.P., Caldarola,S., Loreni,F., Amaldi,F. (2005) Effect of 3'UTR length on the translational regulation of 5'-terminal oligopyrimidine mRNAs. *Gene* 344: 213-20.
- Levey,I.L.**, Stull,G.B., Brinster,R.L. (1978) Poly(A) and synthesis of polyadenylated RNA in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 64(1): 140-8.
- Li,Q.**, Wang,G., Zhang,J., Zhou,P., Wang,T.Y., Cui,W., Luo,M.J., Tan,J.H. (2012) Combined inhibitory effects of pyruvate and low temperature on postovulatory aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* 87(5): 105.
- Liang,X.W.**, Zhu,J.Q., Miao,Y.L., Liu,J.H., Wei,L., Lu,S.S., Hou,Y., Schatten,H., Lu,K.H., Sun,Q.Y. (2008) Loss of methylation imprint of *Snrpn* in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem. Biophys. Res Commun* 371: 16-21.

- Liang,X.W.**, Ge,Z.J., Wie,L., Guo,L., Han,Z.M., Schatten,H., Sun,Q.Y. (2011) The effects of postovulatory aging of mouse oocytes on methylation and expression of imprinted genes at mid-term gestation. *Mol Hum Reprod* 17(9): 562-7.
- Lieberman,B.A.**, Wilmut,I., Brison,D.R. (2009) Clinically failed eggs as a source of normal human embryo stem cells. *Stem Cell Res* 2(3): 188-97.
- Liu,L.**, Ju,J.C., Yang,X. (1998) Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 59(3): 537-45.
- Livak,K.J, Schmittgen,T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-8.
- Lombardi,E.**, Tiverón,M., Inza,R., Valcárcel,A., Young,E., Bisioli,C. (2003) Live birth and normal 1-year follow-up of a baby born after transfer of cryopreserved embryos from rescue intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes. *Fertil Steril* 80(3): 646-8.
- Longo,F.J.** (1974) Ultrastructural changes in rabbit eggs aged in vivo. *Biol Reprod* 11: 22-39.
- Longo,F.J.** (1981) Changes in the zones pellucidae and plasmalemma of aging mouse eggs. *Biol Reprod* 25: 399-411.
- Lu,Q.**, Chen,X., Li,Y., Zhang,X.H., Liang,R., Zhao,Y.P., Wei,L.H., Shen,H. (2012) A live birth of activated one-day-old unfertilized oocyte for a patient who experienced repeatedly near-total fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. *Chin Med J* 125(3): 546-8.
- Lundin,K.**, Sjögren,A., Hamberger,L. (1996) Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 66(1): 118-21.
- Ma,W.**, Zhang,D., Hou,Y., Li,Y.H., Sun,Q.Y., Sun,X.F., Wang,W.H. (2004) Reduced expression of MAD2, BCL2, and MAP kinase activity in pig oocytes after in vitro aging are associated with defects in sister chromatid segregation during meiosis II and embryo fragmentation after activation. *Biol Reprod* 72(2): 373-83.
- Macnicol,M.C., Macnicol,A.M.** (2010) Developmental Timing of mRNA Translation—Integration of Distinct Regulatory Elements. *Mol Reprod Dev* 77(8): 662–669.
- Mailhes,J.B.**, Young,D., London,S.N. (1998) Postovulatory ageing of mouse oocytes in vivo and premature centromere separation and aneuploidy. *Biol Reprod* 58(5): 1206-10.
- Marston,J.H., Chang,M.C.** (1964) The fertilizable life of ova and their morphology following delays insemination in mature and immature mice. *J Exp Zool* 155: 237-252.
- Matthews,G., Colman,A.** (1991) A highly efficient, cell-free translation/translocation system prepared from *Xenopus* eggs. *Nucleic Acids Res* 19(23): 6405-12.

- McDonald,S.D.,** Han,Z., Mulla,S., Murphy,K.E., Beyene,J., Ohlsson,A.; on behalf of the Knowledge Synthesis Group (2009) Preterm birth and low birth weight among in vitro fertilization singletons: A systematic review and meta-analyses. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 146: 138–148.
- McKiernan,S.H., Bavister,B.D.** (1998) Gonadotrophin stimulation of donor females decreases post-implantation viability of cultured one-cell hamster embryos. *Hum Reprod* 13(3): 724-9.
- Meehan,R.R.** (2003) DNA methylation in animal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 14: 53–65.
- Miao,Y.L., Kikuchi,K., Sun,Q.Y., Schatten,H. (2009) Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 15: 573-585.
- Mikamo,K.** (1968) Intrafollicular overripeness and teratologic development. *Cytogenetics* 7: 212-233.
- Mikamo,K., Hamaguchi,H.** (1975) Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes. In Blandau, R.J. (ed.) *Aging Gametes. Their Biology and Pathology. Proceedings of the International Symposium on Aging Gametes, Seattle, Washington, June 13-16, S.Karger, Basel*, pp. 72-97.
- Mtango,N.R.,** Potireddy,S., Latham,K.E. (2008) Oocyte quality and maternal control of development. *Int Rev Cell Mol Biol* 268: 223-90.
- Newmeyer,D.D.,** Farschon,D.M., Reed,J.C. (1994) Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79(2): 353-64.
- Nieuwkoop,P.D., Faber,J.** (1975) Normal table of *Xenopus levis* (Daudin). (Elsevier/ North-Holland Publishing Co, Amsterdam, The Netherlands).
- Osman,C.,** Merkwirth,C., Langer,T. (2009) Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* 122(Pt 21): 3823-30.
- Ottolenghi,C.,** Uda,M., Hamatani,T., Crisponi,L., Garcia,J.E., Ko,M., Pilia,G., Sforza,C., Schlessinger,D., Forabosco,A. (2004) Aging of oocyte, ovary, and human reproduction. *Ann N Y Acad Sci* 1034: 117-31.
- Paillard,L.,** Omilli,F., Legagneux,V., Bassez,T., Maniey,D., Osborne,H.B. (1998) EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *EMBO J* 17: 278-287.
- Park,K.S.,** Song,H.B., Chun,S.S. (2000) Late fertilization of unfertilized human oocytes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles: conventional insemination versus ICSI. *J Assist Reprod Genet* 17(8): 419-24.
- Paynton,B.V.,** Rempel,R., Bachvarova,R. (1988) Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 129: 304-314.

- Petrová,I., Sedmíková,M., Petr,J., Vodková,Z., Pytloun,P., Chmelíková,E., Rehák,D., Ctrnáctá,A., Rajmon,R., Jílek,F.** (2009) The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *J Reprod Dev* 55(1): 75-82.
- Pflüger,E.** (1882) Versuche der Befruchtung überreifer Eier. *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere* 29: 76-77.
- Pique,M., Lopez,J.M., Foissac,S., Guigo,R., Mendez,R.** (2008) A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* 132: 434-448.
- Plachot,M., De Grouchy,J., Junca,A.M., Mandelbaum,J., Salat-Baroux,J. Cohen,J.** (1988) Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance? *Hum Reprod* 3: 125-127.
- Polański,Z.** (1986) In-vivo and in-vitro maturation rate of oocytes from two strains of mice. *J Reprod Fertil* 78(1): 103-9.
- Pradet-Balade,B., Boulmé,F., Beug,H., Müllner,E.W., Garcia-Sanz,J.A.** (2001) Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem Sci* 26(4): 225-9.
- Pratt,H.P., Bolton,V.N., Gudgeon,K.A.** (1983) The legacy from the oocyte and its role in controlling early development of the mouse embryo. *Ciba Found Symp* 98: 197-227.
- Presicce,G.A., Yang,X.** (1994) Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol Reprod Dev* 37: 61-68.
- Pursley,J.R., Silcox,R.W., Wiltbank,M.C.** (1998) Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81(8): 2139-44.
- Radford,H.E., Meijer,H.A., De Moor,C.H.** (2008) Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1779(4): 217-229.
- Rassa,J.C., Wilson,G.M., Brewer,G.A., Parks,G.D.** (2000) Spacing constraints on reinitiation of paramyxovirus transcription: the gene end U tract acts as a spacer to separate gene end from gene start sites. *Virology* 274: 438-449.
- Reissmann,T., Schally,A.V., Bouchard,P., Riethmüller,H., Engel,J.** (2000) The LHRH antagonist cetorelix: a review. *Hum Reprod Update* 6(4): 322-31.
- Renard,J.-P., Baldacci,P., Richoux-Duranthon,V., Pournin,S., Babinet,C.** (1994) A maternal factor affecting mouse blastocyst formation. *Development* 120: 797-802.
- Richter,J.D.** (2008) Breaking the code of polyadenylation-induced translation. *Cell* 132: 335-337.
- Richter,J.D.** (2010) Translational control of synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans.* 38(6): 1527-30.

- Romundstad,L.B.**, Romundstad,P.R., Sunde,A., Von Düring,V., Skjærven,R., Gunnell,D., Vatten,L.J. (2008) Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilization: a population-based cohort study. *Lancet* 372: 737–43.
- Runft,L.L.**, Jaffe,L.A., Mehlmann,L.M. (2002) Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol* 245(2): 237-54.
- Sagata,N.**, Shiokawa,K., Yamana,K. (1980) A study on the steady-state population of poly(A)+RNA during early development of *Xenopus levis*. *Dev Biol* 77(2): 431-48.
- Saito,H.**, Koike,K., Saito,T., Nohara,M., Kawagoe,S., Hiroi,M. (1993) Aging changes in the alignment of chromosomes after human chorionic gonadotropin stimulation may be a possible cause of decreased fertility in mice. *Horm Res* 39: 28-31.
- Sakai,N., Endo,A.** (1988) Effects of delayed mating on preimplantation embryos in spontaneously ovulated mice. *Gamete Res* 19(4): 381-5.
- Sakurada,K.**, Ishikawa,H., Endo,A. (1996) Cytogenetic effects of advanced maternal age and delayed fertilization on first-cleavage mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet* 72: 46-49.
- Schatten,H.**, Schatten,G., Mazia,D., Balczon,R. Simerly,C. (1986) Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 105-109.
- Schieve,L.A.**, Meikle,S.F., Ferre,C., Peterson,H.B., Jeng,G., Wilcox,L.S. (2002) Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 346(10): 731-7.
- Shalgi,Dr.R.**, Kaplan,R., Kraicer,P.F. (1985) The influence of postovulatory age on the rate of cleavage in in-vitro fertilized rat oocytes. *Gamete Research* 11(1): 99-106.
- Shalom-paz,E.**, Alshalati,J., Shehata,F., Jimenez,L., Son,W.Y., Holzer,H., Tan,S.L., Almog,B. (2011) Clinical and economic analysis of rescue intracytoplasmic sperm injection cycles. *Gynecol Endocrinol* 27(12): 993-6.
- Sharova,L.V.**, Sharov,A.A., Nedorezov,T., Piao,Y., Shaik,N., Ko,M.S. (2009) Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res* 16(1): 45-58.
- Shaver,E.L., Carr,D.H.** (1967) Chromosome abnormalities in rabbit blastocysts following delayed fertilization. *J Reprod Fert* 14: 415-420.
- Showell,C., Conlon,F.L.** (2007) Decoding development in *Xenopus tropicalis*. *Genesis* 45: 418-426.
- Sive,H.**, Grainger,R.M., Harland,R.M. (2000) Early development of *Xenopus levis*, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).
- Stancheva,I., Meehan,R.R.** (2000) Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 14: 313-327.

- Stancheva,I.,** El-Maarri,O., Walter,J., Niveleau,A., Meehan,R.R. (2002) DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus levis* embryos. *Dev Biol* 243(1): 155-65.
- Steuerwald,N.M.,** Steuerwald,M.D., Mailhes,J.B. (2005) Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Reprod* 11(9): 623-30.
- Sutton-McDowall,M.L.,** Gilchrist,R.B., Thompson,J.G. (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 139(4): 685-95.
- Szollosi,D.** (1975) Mammalian eggs aging in the Fallopian Tubes. In Blandau, R.J. (ed.) *Aging Gametes. Their Biology and Pathology. Proceedings of the International Symposium on Aging Gametes*, Seattle, Washington, June 13-16, S.Karger, Basel, pp. 98-121.
- Tadros,W., Lipshitz,H.D.** (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136: 3033-3042.
- Takahashi,T.,** Igarashi,H., Kawagoe,J., Amita,M., Hara,S., Kurachi,H. (2009) Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium. *Biol Reprod* (3): 493-502.
- Tanguay,R.L., Gallie,D.R.** (1996) Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 16(1): 146-56.
- Tarín,J.J.** (1996) Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos 2(10): 717-24.
- Tarín,J.J.,** Pérez-Albalá,S., Aguilar,A., Miñarro,J., Hermenegildo,C., Cano,A. (1999) Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. *Biol Reprod* 61(5): 1347-55.
- Tarín,J.J.,** Pérez-Albalá,S., Cano,A. (2000) Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum Reprod Update*. 6(6): 532-49.
- Tarín,J.J.,** Pérez-Albalá,S., Pérez-Hoyos,S., Cano,A. (2002) Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biol Reprod* 66(2): 495-9.
- Thélie,A.,** Papillier,P., Pannetier,S., Perreau,C., Traverso,J.M., Uzbekova,S., Mermillod,P., Joly,C., Humblot,P., Dalbiès-Tran,R. (2007) Differential regulation of abundance and deadenylation of maternal transcripts during bovine oocyte maturation in vitro and in vivo. *BMC Developmental Biology* 7: 125.
- Tian,B.,** Hu,J., Zhang,H., Lutz,C.S. (2005) A large-scale analysis of mRNA Polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 3(1): 201-212.
- Tiveron,C.,** Marchetti,F., Bassani,B., Pacchierotti,F. (1992) Griseofulvin-induced aneuploidy and meiotic delay in female mouse germ cells. I. Cytogenetic analysis of metaphase II oocytes. *Mutat Res* 266(2): 143-50.

- Tsuchiya,Y., Yamashita,S.** (2011) Anti-apoptotic activity and proteasome-mediated degradation of *Xenopus* Mcl-1 protein in egg extracts. *J Biol Chem* 286(18): 15806-14.
- Vallee,M., Aiba,K., Piao,Y., Palin,M.F., Ko,M.S., Sirard,M.A.** (2008) Comparative analysis of oocyte transcript profiles reveals a high degree of conservation among species. *Reproduction* 135: 439-448.
- Van Blerkom,J.** (1981) Structural relationship and posttranslational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12): 7629-33.
- Van de Auwera,I., D'Hooghe,T.** (2001) Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 16(6): 1237-1243.
- Van Wissen,B., Bomsel-Helmreich,O., Debey,P., Eisenberg,C., Vautier,D., Pennehouat,G.** (1991) Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after GnRHa treatment: An analysis of individual oocytes. *Hum Reprod* 6: 879-884.
- Varnum,S.M., Wormington,W.M.** (1990) Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: a default mechanism for translational control. *Genes Dev* 4: 2278-2286.
- Vassalli,J.D., Stutz,A.** (1995) Translational control. Awakening dormant mRNAs. *Curr Biol* 5(5): 476-9.
- Veenstra,G.J.C., Wolffe,A.P.** (2001) Constitutive genomic methylation during embryonic development of *Xenopus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1521: 39-44.
- Vickers,A.D.** (1969) Delayed fertilization and chromosomal anomalies in mouse embryos. *J Reprod Fert* 20: 69-76.
- Voeltz,G.K., Steitz,J.A.** (1998) AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol Cell Biol* 18: 7537-7545.
- Wang,Y.Y., Charlesworth,A., Byrd,S.M., Gregerson,R., MacNicol,M.C., MacNicol,A.M.** (2008) A novel mRNA 3' untranslated region translational control sequence regulates *Xenopus* Wee1 mRNA translation. *Dev Biol* 317(2): 454-66.
- Wilcox,A.J., Weinberg,C.R., Baird,D.D.** (1998) Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Hum Reprod* 13: 394-397.
- Winston,R.M., Hardy,K.** (2002) Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments? *Nat Cell Biol* 4 Suppl: s14-8.
- Wisborg,K., Ingerslev,H.J., Henriksen,T.B.** (2010) IVF and stillbirth: a prospective follow-up study. *Hum Reprod* 25(5): 1312-6.
- Witschi,E.** (1952) Overripeness of the egg as a cause of twinning and teratogenesis: a review. *Cancer Res* 12: 763-786.

- Witschi,E., Laguens,R.** (1963) Chromosomal aberrations in embryos from overripe eggs. *Dev Biol* 7: 605-16.
- Wortzman,G.B., Evans,J.P.** (2004) Membrane and cortical abnormalities in post-ovulatory aged eggs: analysis of fertilizability and establishment of the membrane block to polyspermy. *Mol Hum Reprod* 11(1): 1-9.
- Wu,B., Ignatz,G., Currie,W.B., Yang,X.** (1997) Expression of Mos protooncoprotein in bovine oocytes during maturation in vitro. *Biol Reprod* 56: 260-265.
- Xu,Z., Abbott,A., Kopf,G.S., Schultz,R.M., Ducibella,T.** (1997) Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biol Reprod* 57: 743-750.
- Yamamoto,M., Ingalls,T.H.** (1972) Delayed fertilization and chromosome anomalies in the hamster embryo. *Science* 176: 518-521.
- Yang,X., Presicce,G.A., Moraghan,L., Jiang,S.E., Foote,R.H.** (1994) Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 41(2): 395-403.
- Young,R.J., Sweeney,K., Bedford,J.M.** (1978) Undine and guanosine incorporation by the mouse one-cell embryo. *Embryol exp Morph* 44: 133-148.
- Yuzpe,A.A., Liu,Z., Fluker,M.R.** (2000) Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil Steril* (6): 1115-9.
- Zhang,D.X., Cui,X.S., Kim,N.H.** (2010 a) Molecular characterization and polyadenylation-regulated expression of cyclin B1 and Cdc2 in porcine oocytes and early parthenotes. *Mol Reprod Dev* 77(1): 38-50.
- Zhang,N.Y., Sun,H.X., Hu,Y.L., Wang,B., Xu,Z.P.** (2010 b) Early rescue intracytoplasmic sperm injection: safe for complete IVF failure. *Zhonghua Nan Ke Xue* 16(2): 158-60.
- Zhang,N., Wakai,T., Fissore,R.A.** (2011) Caffeine alleviates the Deterioration of Ca²⁺ release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 78: 684-701.
- Zheng,Q., Wang,X.J.** (2008) GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 36: W358-W363.
- Zhu,L., Xi,Q., Nie,R., Chen,W., Zhang,H., Li,Y.** (2011) Rescue intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study. *J Reprod Med* 56(9-10): 410-4.

7 Anhang

Tab. A1: Während der Eialterung am stärksten signalreduzierte Sondensätze.

Aufgelistet sind alle Sondensätze, deren Signalstärke in gealterten Eiern ≥ 4 fach reduziert war, entspricht einer log ratio (log) von $\leq -2,00$. Die Zuordnung der Ref-Seq Transkript ID, des Gen-Namen bzw. der mRNA Bezeichnung zu der Affymetrix Sondensatz ID folgt der na30 Annotation von Affymetrix vom 23 November 2009.

Affymetrix Sondensatz ID	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	mRNA	Änderung der Signalstärke fach	log
Str.31422.1.A1_at	NM_001078970	beta-glucosidase (3D533)	MGC147552	23,53	-4,56
Str.8703.1.S1_at	NM_001016550	zinc finger protein 593	znf593	20,32	-4,34
Str.18172.2.A1_at	---	---	---	17,13	-4,10
Str.27732.1.S1_at	NM_001011236	GTP binding protein 5	TNeu138b06.1	16,18	-4,02
Str.1698.1.S1_at	NM_001039733	coiled-coil domain containing 103	ccdc103	13,33	-3,74
Str.37803.1.A1_at	---	---	---	11,91	-3,57
Str.39705.1.S1_s_at	NM_001078857	integrator complex subunit 12	ints12	11,03	-3,46
Str.5386.1.S1_at	NM_001001251	phosphoglucomutase 1	pgm1	10,55	-3,40
Str.22118.1.S1_at	NM_001097402	hypothetical protein LOC100038295	LOC100038295	10,24	-3,36
Str.52222.2.S1_at	---	---	---	10,12	-3,34
Str.11585.1.S1_at	NM_001078752	hypothetical protein MGC146177	MGC146177	9,71	-3,28
Str.52176.1.S1_at	NM_001114234	triosephosphate isomerase 1	tpi1	9,60	-3,26
Str.32304.1.S1_at	---	---	---	9,42	-3,24
StrEns.6610.1.S1_s_at	---	---	---	9,21	-3,20
Str.38636.1.A1_a_at	---	---	---	9,17	-3,20
Str.51681.1.S1_at	NM_203881	hypothetical protein MGC75752	MGC75752	9,12	-3,19
Str.10733.1.S1_at	NM_001006779	asparagine-linked glycosylation 5, dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase homolog (S. cerevisiae)	alg5	8,39	-3,07
Str.10366.1.S1_at	NM_001006889	microsomal glutathione S-transferase 3	mgst3	8,21	-3,04
Str.30146.2.A1_a_at	---	---	---	8,15	-3,03
Str.51685.1.S1_a_at	---	---	---	8,07	-3,01
Str.2749.1.S2_at	NM_001030439	atp5a1 protein	atp5a1	8,02	-3,00
Str.84.1.S1_at	NM_001006693	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	mdh1	8,00	-3,00
Str.2828.1.S1_s_at	NM_001015790 ///	hypothetical protein LOC549708 ///	LOC549708 ///	7,93	-2,99
	NM_001016954	MGC108386 protein	MGC108386		
Str.10020.1.A1_at	---	---	---	7,70	-2,95
Str.11154.1.S1_at	NM_001011476	selenoprotein S	TNeu072i15.1	7,70	-2,94
StrEns.10216.1.S1_a_at	NM_001126791	hypothetical protein LOC100145315	LOC100145315	7,59	-2,92
StrEns.20.1.S1_s_at	NM_203881	hypothetical protein MGC75752	MGC75752	7,50	-2,91
Str.3146.4.A1_at	---	---	---	7,49	-2,90
Str.24356.1.A1_at	---	hypothetical protein LOC100170436	LOC100170436	7,38	-2,88
StrEns.21.1.S1_at	---	---	---	7,37	-2,88
Str.31301.1.S1_at	---	---	---	7,32	-2,87
Str.50171.1.A1_s_at	---	---	---	7,06	-2,82
Str.10400.1.S1_a_at	NM_001017271 ///	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1 ///	bloc1s1 ///	7,02	-2,81
	NM_001078781	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 1	bloc1s1		
Str.26997.1.S1_at	NM_001044441	Novel Trtraspanin family protein	TGas124j14.1	6,98	-2,80
Str.225.1.S1_at	---	---	---	6,86	-2,78
Str.1362.1.S1_a_at	NM_001015838	MGC97811 protein	MGC97811	6,85	-2,78
Str.13533.1.A1_at	---	---	---	6,73	-2,75
Str.27670.1.S1_at	NM_203787	ATP synthase subunit B	MGC75766	6,70	-2,74
Str.38992.1.S1_at	---	---	---	6,60	-2,72
Str.4856.1.S1_at	NM_203762	hypothetical protein MGC76048	MGC76048	6,57	-2,72
Str.24321.1.S1_at	---	Finished cDNA, clone TTPA017n04	kifc1	6,49	-2,70

Affymetrix Sondensatz ID	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	mRNA	Änderung der Signalstärke fach log	
Str.22154.1.S1_at	---	Protein MGR2 homolog	LOC100125151	6,43	-2,69
Str.33782.1.S1_at	NM_001126526	hypothetical protein LOC100144954	LOC100144954	6,40	-2,68
Str.2749.1.S1_at	NM_001030439	atp5a1 protein	atp5a1	6,37	-2,67
Str.5673.1.S1_at	NM_001006853	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	hdlbp	6,29	-2,65
StrJgi.5525.1.S1_s_at	---	---	---	6,24	-2,64
Str.2863.1.S1_at	NM_001016806	Sp2 transcription factor	sp2	6,22	-2,64
Str.20522.1.S1_s_at	NM_203811	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	TGas042k20.1	6,20	-2,63
Str.15297.1.S1_at	NM_001007895	grhpr protein	grhpr	6,11	-2,61
Str.1047.1.S1_at	NM_001016551	prohibitin 2	TGas064h09.1	6,08	-2,60
Str.8471.1.S1_at	NM_001030491	osbpl11 protein	osbpl11	6,07	-2,60
Str.27322.1.S1_at	NM_001011004	MUS81 endonuclease homolog	mus81	6,06	-2,60
StrEns.9818.1.S1_at	---	---	---	6,01	-2,59
Str.42401.1.A1_at	---	---	---	5,96	-2,57
Str.6777.1.S1_at	NM_001016724	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	eif3s9	5,94	-2,57
Str.27160.3.S1_a_at	NM_203971	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2	slc34a2	5,92	-2,57
Str.39262.1.S1_at	NM_001142240	hypothetical protein LOC100216289	LOC100216289	5,91	-2,56
Str.8361.2.A1_s_at	---	hypothetical LOC496593	LOC496593	5,89	-2,56
Str.10400.2.S1_at	NM_001078781	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 1	bloc1s1	5,88	-2,56
Str.33490.1.A1_at	---	---	---	5,88	-2,55
Str.710.1.S1_at	NM_203705	hypothetical protein MGC75949	MGC75949	5,85	-2,55
Str.24734.1.S1_at	---	---	---	5,83	-2,54
Str.15516.1.S1_a_at	NM_001004823	pelota homolog	pelo	5,82	-2,54
Str.3283.1.S1_at	NM_001008006	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	TNeu036b14.1	5,79	-2,53
Str.31382.1.S1_at	---	---	---	5,77	-2,53
Str.15331.1.S1_at	NM_001011079	hypothetical LOC496490	LOC496490	5,72	-2,52
Str.5464.1.S1_at	NM_001126911	hypothetical protein LOC100145458	LOC100145458	5,71	-2,51
Str.9973.2.S1_a_at	NM_001005098	MGC89869 protein	MGC89869	5,62	-2,49
Str.6630.2.S1_at	---	---	---	5,61	-2,49
Str.20154.1.A1_at	---	---	---	5,59	-2,48
Str.31426.1.A1_at	NM_001097322	hypothetical protein LOC100037883	LOC100037883	5,58	-2,48
Str.11112.1.S1_at	NM_001008206	oprs1 protein	oprs1	5,54	-2,47
Str.22074.2.S1_a_at	---	---	---	5,50	-2,46
StrEns.9654.1.S1_s_at	---	hypothetical protein LOC100145510	LOC100145510	5,49	-2,46
Str.25205.1.A1_at	NM_001130365	hypothetical protein LOC100170594	LOC100170594	5,48	-2,45
Str.691.1.S1_at	---	tubulin folding cofactor A	tbca	5,48	-2,45
Str.8814.1.S1_x_at	NM_001078982	tubulin, beta 2C	tubb2c	5,45	-2,45
Str.27682.1.S1_at	---	histidine triad nucleotide binding protein 2	hint2	5,42	-2,44
Str.20.1.S1_a_at	NM_001037267	Protein LSM12 homolog	lsm12	5,41	-2,43
StrEns.4.1.S1_at	---	---	---	5,39	-2,43
Str.37988.1.A1_at	---	---	---	5,36	-2,42
Str.9570.1.S1_at	NM_001011468	hypothetical LOC496959	LOC496959	5,35	-2,42
Str.10919.1.S1_at	NM_001011257	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	psma3	5,31	-2,41
Str.31556.1.S1_at	NM_001030459	MGC97507 protein	MGC97507	5,30	-2,41
Str.110.1.A1_at	---	---	---	5,27	-2,40
Str.16215.1.S1_at	NM_001016002	death associated protein 3	dap3	5,26	-2,39
Str.11264.1.S1_at	---	---	---	5,25	-2,39
Str.6801.1.S1_at	---	---	---	5,24	-2,39
Str.2958.1.S1_at	NM_001004803	MGC69366 protein	MGC69366	5,23	-2,39
Str.3183.1.S1_a_at	NM_001011450	hypothetical LOC496939	LOC496939	5,22	-2,38

Affymetrix Sondensatz ID	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	mRNA	Änderung der Signalstärke fach log	
StrEns.6221.1.S1_at	NM_001017243	mitochondrial ATP synthase regulatory component factor B	atp5s	5,18	-2,37
Str.17855.1.S1_at	---	---	---	5,14	-2,36
Str.4819.1.S1_at	---	---	---	5,13	-2,36
Str.5375.2.S1_a_at	---	uridine monophosphate synthetase (orotate phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-decarboxylase)	umps	5,12	-2,36
Str.31377.1.S1_at	---	hypothetical protein LOC100127803	LOC100127803	5,11	-2,35
Str.7914.1.S1_at	---	---	---	5,10	-2,35
Str.6801.1.S1_s_at	---	---	---	5,10	-2,35
Str.1454.1.S1_at	NM_001015688	similar to dJ310O13.3 (novel protein)	rgd1305096	5,10	-2,35
Str.15861.1.S1_at	NM_001011070	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	rabep1	5,05	-2,34
Str.15315.1.S2_at	NM_001126700	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	hmgcs1	5,05	-2,34
Str.20255.1.S1_at	NM_001039742	hypothetical protein LOC594885	LOC594885	5,03	-2,33
Str.27169.1.S1_at	NM_001016666	hypothetical protein LOC549420	LOC549420	5,00	-2,32
Str.24454.1.S1_at	NM_001005105	ribosomal protein L34b	TTpA011b11.1	4,98	-2,32
StrEns.5127.1.S1_s_at	---	---	---	4,95	-2,31
Str.21190.1.S1_at	---	---	---	4,95	-2,31
Str.22053.1.S1_at	NM_001102946	hypothetical protein LOC100125021	LOC100125021	4,92	-2,30
Str.15132.1.S1_at	---	---	---	4,92	-2,30
Str.27670.2.S1_at	NM_001126537	hypothetical protein LOC100144971	LOC100144971	4,92	-2,30
Str.67.1.S1_at	---	---	---	4,88	-2,29
StrEns.9993.1.S1_at	NM_001126528	succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	sdhb	4,88	-2,29
Str.8814.1.S1_at	NM_001078982	tubulin, beta 2C	tubb2c	4,88	-2,29
Str.6823.1.S1_at	NM_001079159	hypothetical protein MGC147133	MGC147133	4,87	-2,28
Str.14582.1.A1_at	NM_001102928	G-protein signaling modulator 1 (AGS3-like)	gpsm1	4,87	-2,28
Str.7062.1.S1_at	---	---	---	4,85	-2,28
Str.28061.1.S1_at	NM_001016789	Surfeit locus protein 1	surf1	4,82	-2,27
Str.103.1.A1_at	---	---	---	4,82	-2,27
Str.15044.1.S1_at	---	hypothetical protein LOC100127777	LOC100127777	4,82	-2,27
Str.52223.1.S1_at	NM_001044430	ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD) (uccr)	TNeu126i07.1	4,80	-2,26
Str.1984.1.S1_at	NM_001006750	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	slc9a3r1	4,78	-2,26
Str.4806.1.S1_at	NM_001078697	hypothetical LOC548397	ptcd3	4,76	-2,25
StrAffx.238.1.S1_at	NM_001078857	integrator complex subunit 12	ints12	4,70	-2,23
Str.31989.1.A1_at	---	hypothetical protein LOC100145510	LOC100145510	4,69	-2,23
Str.6806.3.S2_at	---	---	---	4,67	-2,22
Str.20053.1.S1_at	NM_001103046	hypothetical protein LOC100125149	wdr92	4,67	-2,22
Str.8703.1.S1_a_at	NM_001016550	zinc finger protein 593	znf593	4,63	-2,21
Str.15941.1.S1_at	NM_001011451	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	hs3st1	4,63	-2,21
Str.10892.1.S1_x_at	---	---	---	4,62	-2,21
Str.38351.1.S1_at	NM_001127910	hypothetical protein LOC100158470	LOC100158470	4,62	-2,21
Str.21526.2.A1_s_at	---	---	---	4,59	-2,20
Str.21570.1.S1_at	---	---	---	4,59	-2,20
Str.26804.1.S1_at	NM_001016065	hypothetical protein LOC548819	LOC548819	4,59	-2,20
Str.24209.1.A1_at	---	---	---	4,56	-2,19
Str.8210.1.S1_at	NM_001005132	partner of NOB1 homolog	pno1	4,55	-2,19
Str.16126.1.S1_at	NM_001011316	RIKEN cDNA 0610007C21 gene	0610007c21rik	4,53	-2,18
Str.10244.1.S1_at	NM_001005120	mitochondrial ribosomal protein L24	mrpl24	4,53	-2,18
Str.49042.1.S1_at	---	---	---	4,45	-2,15
Str.6934.1.S1_at	NM_001007879	shmt2 protein	shmt2	4,45	-2,15
Str.52222.6.S1_at	---	---	---	4,43	-2,15
Str.9960.1.S1_at	NM_203721	FK506 binding protein 6	fkbp6	4,42	-2,14

Affymetrix Sondensatz ID	Ref-Seq Transkript ID	Gen-Name	mRNA	Änderung der Signalstärke	
				fach	log
Str.51873.1.S1_s_at	NM_001015781 /// NM_001016779	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa /// MGC108352 protein	eif3s2 /// MGC108352	4,41	-2,14
Str.10872.1.S1_at	---	---	---	4,40	-2,14
Str.20852.1.S1_at	NM_001130265	hypothetical protein LOC100170482	LOC10017048 2	4,39	-2,13
Str.10062.1.S1_at	---	---	---	4,39	-2,13
Str.17424.1.S1_at	NM_001079446	mitochondrial ribosomal protein L22	mrpl22	4,38	-2,13
Str.37908.1.S1_a_at	---	---	---	4,37	-2,13
Str.1976.1.S1_at	---	---	---	4,37	-2,13
Str.7594.1.S1_at	NM_203903	hypothetical protein MGC75973	MGC75973	4,37	-2,13
Str.12843.1.A1_at	NM_001127091	Hypothetical protein LOC100145717 (LOC100145717), mRNA	LOC10014571 7	4,37	-2,13
Str.37988.1.A1_a_at	---	---	---	4,33	-2,12
Str.3208.1.S2_at	NM_001016757	nucleoporin 37kDa	nup37	4,33	-2,11
Str.115.1.S1_at	NM_203519	egg cortical granule lectin	LOC394441	4,31	-2,11
Str.41352.1.S1_s_at	---	---	---	4,31	-2,11
Str.5017.1.S1_at	NM_001030487	exosome component 2	exosc2	4,31	-2,11
StrEns.1524.1.S1_s_at	NM_001113004	hypothetical protein LOC100127660	LOC10012766 0	4,31	-2,11
Str.20261.1.S1_at	NM_001123464	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	akt2	4,31	-2,11
Str.618.1.S1_at	NM_001079066	Hypothetical protein MGC147163, mRNA (cDNA clone MGC:135643 IMAGE:7568025)	MGC147163	4,30	-2,11
Str.27826.1.S1_at	NM_001030473	MGC97780 protein	MGC97780	4,30	-2,11
Str.2704.1.S1_at	NM_001123409	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	dhx16	4,29	-2,10
Str.11139.1.S1_at	NM_001102786	hypothetical protein LOC100124818	LOC10012481 8	4,28	-2,10
Str.15289.1.S1_at	---	---	---	4,27	-2,09
Str.33970.1.S1_at	---	---	---	4,25	-2,09
Str.25159.1.A1_s_at	NM_001005132	partner of NOB1 homolog	pno1	4,21	-2,07
Str.1982.1.A1_at	---	---	---	4,19	-2,07
Str.29354.1.A1_at	---	---	---	4,19	-2,07
Str.12638.1.S1_at	NM_001011059	hypothetical LOC496469	LOC496469	4,18	-2,06
Str.11124.1.S1_at	NM_001016047	annexin A4	anxa4	4,17	-2,06
Str.10110.1.S1_at	NM_203991	zinc finger protein 668	znf668	4,16	-2,06
Str.1699.1.S1_at	NM_001011412	mitochondrial malate dehydrogenase 2	Mdh2	4,16	-2,06
Str.38517.1.A1_at	---	---	---	4,16	-2,06
Str.21568.1.A1_at	NM_001079322	transcription factor 25 (basic helix-loop- helix)	tcf25	4,15	-2,05
StrEns.6762.1.S1_at	---	---	---	4,14	-2,05
Str.4861.1.S1_at	NM_001126644	hypothetical protein LOC100145138	LOC10014513 8	4,14	-2,05
Str.5666.1.A1_at	---	---	---	4,12	-2,04
StrJgi.8914.1.S1_s_at	NM_203519	egg cortical granule lectin	LOC394441	4,11	-2,04
Str.9389.2.S1_a_at	---	---	---	4,10	-2,03
Str.7079.1.S1_at	NM_001004904	MGC89011 protein	MGC89011	4,08	-2,03
Str.31783.1.A1_at	---	---	---	4,07	-2,02
Str.24477.4.S1_at	---	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog	tsr1	4,03	-2,01
Str.38814.1.S1_at	NM_001078760	MAX dimerization protein 1	mxd1	4,03	-2,01
Str.2886.1.S1_at	NM_001006785	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	psmc3	4,02	-2,01
Str.20146.1.S1_at	NM_204096	ST3 beta-galactoside alpha-2,3- sialyltransferase 6	st3gal6	4,01	-2,01
Str.5337.1.S1_at	NM_203813	enolase 1, (alpha)	eno1	4,00	-2,00
Str.51673.1.S1_a_at	NM_001044461	creatine kinase, brain	ckb	4,00	-2,00

Tab. A2: Gen-Ontologie Analyse der in gealterten Eiern ≥ 2 fach signalverminderten Sondensätze.

906 Sondensätze, die in gealterten Eiern in der Microarray Analyse eine ≥ 2 fach reduzierte Signalstärke zeigten, wurden im Gene Ontology Enrichment Analysis Toolkit (GO EAST) gegen den gesamten Genchip analysiert. **q** zeigt Anzahl der in gealterten Eiern veränderten Sondensätze der entsprechenden GO, **m** die Anzahl der zu dieser GO zugehörigen insgesamt auf dem Chip vorhandenen Sondensätze. **LR** (*log₂ odds ratio*) ist der Logarithmus zur Base 2 des Verhältnisses von (q/k) zu (m/t) mit **k** = Anzahl der zur Analyse eingegeben Sondensätze = 906 und **t** = Anzahl aller auf dem Genchip befindlichen Sondensätze = 59.021. **p** ist die hypergeometrische Wahrscheinlichkeit die jeweilige Anzahl an Sondensätzen für die bestimmte GO zu erhalten unter der Nullhypothese, dass diese per Zufall gefunden wurden. Je kleiner der p-Wert, desto signifikanter die Anreicherung. Aufgelistet sind nur die GO, die ≥ 2 fach angereichert sind mit $p < 0,01$. Die letzten beiden Spalten geben zusätzlich an, ob die GO, deren Anreicherung in während der Eialterung signalverminderten Sondensätzen gefunden wurde, auch in nicht signalveränderten (n.v-1 bzw. n.v-2) Sondensätzen angereichert vorliegt. n.v-1 und n.v-2 sind zwei unabhängige GO EAST Analysen von je 1000 im Array als nicht verändert bestimmten Sondensätzen gegen den gesamten Genchip.

GO ID	GO Term / biologischer Prozess	q	m	LR	p	n.v-1	n.v-2
GO:0006544	glycine metabolic process	3	6	5,026	0,00321971	-	-
GO:0045333	cellular respiration	9	25	4,552	8,91E-09	-	-
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	7	23	4,309	3,61E-06	-	-
GO:0009060	aerobic respiration	7	23	4,309	3,61E-06	-	-
GO:0006096	glycolysis	9	34	4,108	1,80E-07	-	-
GO:0006007	glucose catabolic process	9	40	3,874	8,17E-07	-	-
GO:0019320	hexose catabolic process	9	40	3,874	8,17E-07	-	-
GO:0046365	monosaccharide catabolic process	9	40	3,874	8,17E-07	-	-
GO:0016052	carbohydrate catabolic process	9	41	3,838	9,93E-07	-	-
GO:0044724	single-organism carbohydrate catabolic process	9	41	3,838	9,93E-07	-	-
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	9	41	3,838	9,93E-07	-	+
GO:0051258	protein polymerization	8	39	3,740	1,02E-05	-	+
GO:0006006	glucose metabolic process	9	45	3,704	2,34E-06	-	-
GO:0043623	cellular protein complex assembly	11	56	3,678	9,21E-08	+	+
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	16	86	3,599	4,39E-11	-	+
GO:0071822	protein complex subunit organization	14	82	3,475	3,85E-09	+	+
GO:0006461	protein complex assembly	12	71	3,461	9,64E-08	-	+
GO:0070271	protein complex biogenesis	12	71	3,461	9,64E-08	-	+
GO:0015992	proton transport	7	48	3,248	0,00049142	-	-
GO:0006818	hydrogen transport	7	49	3,218	0,00055735	-	-
GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient	6	42	3,218	0,00205487	-	-
GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport	6	42	3,218	0,00205487	-	-
GO:0034220	ion transmembrane transport	6	42	3,218	0,00205487	-	-
GO:0006412	translation	44	317	3,177	5,99E-26	+	+
GO:0042254	ribosome biogenesis	7	51	3,161	0,00070821	-	-
GO:0019318	hexose metabolic process	10	74	3,138	1,66E-05	-	-
GO:0046488	phosphatidylinositol metabolic process	5	37	3,138	0,00986786	+	-
GO:0006364	rRNA processing	5	37	3,138	0,00986786	-	-
GO:0016072	rRNA metabolic process	5	37	3,138	0,00986786	-	-
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	10	75	3,119	1,87E-05	-	+
GO:0051726	regulation of cell cycle	7	54	3,078	0,00100086	+	-

GO ID	GO Term / biologischer Prozess	q	m	LR	p	n.v- 1	n.v- 2
GO:0007018	microtubule-based movement	8	70	2,896	0,00069229	-	+
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	7	63	2,856	0,00243768	-	-
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	16	149	2,806	1,64E-07	-	+
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	55	513	2,804	6,83E-27	+	+
GO:0030163	protein catabolic process	11	103	2,799	4,27E-05	-	+
GO:0034622	cellular macromolecular complex assembly	13	122	2,795	5,09E-06	-	+
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	55	517	2,793	9,85E-27	+	+
GO:0065003	macromolecular complex assembly	14	135	2,756	2,37E-06	-	+
GO:0044085	cellular component biogenesis	22	213	2,750	4,01E-10	-	+
GO:1901575	organic substance catabolic process	24	241	2,698	1,00E-10	-	+
GO:0006928	cellular component movement	10	102	2,675	0,00026111	-	+
GO:0009152	purine ribonucleotide biosynthetic process	10	108	2,593	0,00041681	+	-
GO:0010467	gene expression	55	595	2,590	9,63E-24	+	+
GO:0022607	cellular component assembly	15	164	2,575	3,98E-06	-	+
GO:0009260	ribonucleotide biosynthetic process	10	110	2,566	0,0004812	+	-
GO:0046390	ribose phosphate biosynthetic process	10	110	2,566	0,0004812	+	-
GO:0009056	catabolic process	25	276	2,561	2,66E-10	-	+
GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process	10	112	2,540	0,00055652	+	-
GO:0034660	ncRNA metabolic process	10	112	2,540	0,00055652	-	+
GO:0034470	ncRNA processing	7	79	2,529	0,00921536	-	+
GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	10	113	2,527	0,00059628	+	-
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	10	114	2,515	0,00063841	+	-
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	10	114	2,515	0,00063841	+	-
GO:0007017	microtubule-based process	9	105	2,481	0,00185397	-	+
GO:0009145	purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	8	95	2,456	0,00500782	+	-
GO:0009201	ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	8	95	2,456	0,00500782	+	-
GO:0009206	purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	8	95	2,456	0,00500782	+	-
GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	10	119	2,453	0,00089263	+	-
GO:0009142	nucleoside triphosphate biosynthetic process	8	96	2,441	0,00532928	+	-
GO:0044723	single-organism carbohydrate metabolic process	14	169	2,432	3,19E-05	+	+
GO:0072522	purine-containing compound biosynthetic process	10	121	2,429	0,00100918	+	-
GO:0044249	cellular biosynthetic process	72	877	2,419	3,56E-28	+	+
GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic process	8	99	2,396	0,00651111	+	-
GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic process	8	99	2,396	0,00651111	+	-
GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	8	99	2,396	0,00651111	+	-
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	74	919	2,391	2,00E-28	+	+
GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process	8	100	2,382	0,00695723	+	-
GO:0046907	intracellular transport	16	201	2,375	9,38E-06	+	+
GO:0009058	biosynthetic process	76	969	2,353	1,77E-28	+	+
GO:0009057	macromolecule catabolic process	11	141	2,345	0,00070821	-	+
GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	15	196	2,318	3,34E-05	+	+
GO:0072521	purine-containing compound metabolic process	10	131	2,314	0,00188519	+	-
GO:0009790	embryo development	12	158	2,307	0,00041375	-	-

GO ID	GO Term / biologischer Prozess	q	m	LR	p	n.v- 1	n.v- 2
GO:0042451	purine nucleoside biosynthetic process	8	106	2,298	0,00981905	+	-
GO:0046129	purine ribonucleoside biosynthetic process	8	106	2,298	0,00981905	+	-
GO:0006629	lipid metabolic process	18	239	2,295	3,84E-06	+	-
GO:1901137	carbohydrate derivative biosynthetic process	15	200	2,289	4,27E-05	+	-
GO:0006886	intracellular protein transport	11	155	2,209	0,00157978	+	+
GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	11	157	2,190	0,00174714	+	-
GO:0051649	establishment of localization in cell	16	229	2,186	4,64E-05	+	+
GO:0044267	cellular protein metabolic process	89	1285	2,174	1,34E-29	+	+
GO:1901293	nucleoside phosphate biosynthetic process	11	161	2,154	0,0021004	+	-
GO:0016192	vesicle-mediated transport	11	161	2,154	0,0021004	+	+
GO:0009116	nucleoside metabolic process	9	134	2,129	0,00981905	+	-
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	9	134	2,129	0,00981905	+	-
GO:0019637	organophosphate metabolic process	18	270	2,119	2,07E-05	+	+
GO:0051641	cellular localization	16	241	2,113	8,58E-05	+	+
GO:0009117	nucleotide metabolic process	12	182	2,103	0,00147533	+	-
GO:0055114	oxidation-reduction process	32	488	2,095	1,36E-09	+	+
GO:0034613	cellular protein localization	11	169	2,084	0,00313202	+	+
GO:0044767	single-organism developmental process	20	308	2,081	7,62E-06	-	+
GO:0070727	cellular macromolecule localization	11	171	2,067	0,00342725	+	+
GO:0044710	single-organism metabolic process	67	1047	2,060	3,60E-20	+	+
GO:0019538	protein metabolic process	101	1580	2,058	6,00E-31	+	+
GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process	12	189	2,048	0,00203497	+	-
GO:0044237	cellular metabolic process	162	2567	2,040	8,64E-51	+	+
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	115	1844	2,022	1,56E-34	+	+
GO:0044238	primary metabolic process	176	2841	2,013	2,33E-54	+	+
GO:0044248	cellular catabolic process	12	194	2,011	0,00247376	-	+
GO:1901135	carbohydrate derivative metabolic process	16	259	2,009	0,00020749	+	-
GO:0044255	cellular lipid metabolic process	10	162	2,008	0,00923255	+	-

Tab. A3: Zuordnung signalreduzierter Sondensätze in 7 Kategorien anhand des Adenylierungsverhaltens der zugehörigen Transkripte.

Sondensätze, deren Signalstärke in gealterten Eiern als reduziert, nicht verändert oder verstärkt bestimmt wurden, sind den von Graindorge *et al.*, 2006 bestimmten 7 Transkriptkategorien zugewiesen worden (Abb. 22). Aufgelistet sind signalreduzierte Sondensätze der jeweiligen Kategorie. Kategorie 7 ist nicht vorhanden, da Graindorge *et al.* keine Transkripte dieser Kategorie (polyadenyliert während Reifung und nach Befruchtung) zuordnen konnten. Die Zuordnung der mRNA Bezeichnung bzw. des Gen-Namen zu der Affymetrix Sondensatz ID folgt der na30 Annotation von Affymetrix vom 23 November 2009. (Tabelle modifiziert nach Kosubek *et al.*, 2010.)

Kategorie 1 (deadenyliert während Reifung, unverändert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.823.1.S1_at	aco2	aconitase 2, mitochondrial
Str.4269.1.S1_at	aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1
Str.6670.1.S1_at	aldoa	aldolase A, fructose-bisphosphate
Str.648.1.S1_at	arl2	ADP-ribosylation factor-like 2
Str.37821.2.S1_a_at	birc4	birc4 protein
Str.6989.1.S1_at	c3orf37	chromosome 3 open reading frame 37
Str.1698.1.S1_at	ccdc103	coiled-coil domain containing 103
Str.10998.1.S1_at	cndp2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)
Str.4820.1.S1_at	eef1a1o	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, oocyte form
Str.47229.1.A1_x_at	eef1a1o	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, oocyte form
Str.8415.1.S1_at	eif3l	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L
Str.27072.2.S1_at	epc1	Enhancer of polycomb homolog 1
Str.27072.1.S1_at	epc1	enhancer of polycomb homolog 1
Str.5017.1.S1_at	exosc2	exosome component 2
Str.6679.1.S1_at	g3bp2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2
Str.1620.1.S1_at	gamt	guanidinoacetate N-methyltransferase
Str.8069.1.S1_at	gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AFFX-Str-gapdh-M_at	gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AFFX-Str-gapdh-5_at	gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AFFX-Str-gapdh-3_at	gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Str.8025.1.S1_a_at	krt18	keratin 18
Str.8680.1.S1_at	ldhb	lactate dehydrogenase B
Str.1431.1.S1_at	LOC100124857	hypothetical protein LOC100124857
Str.22053.1.S1_at	LOC100125021	hypothetical protein LOC100125021
Str.2314.1.S1_at	LOC100125169	Hypothetical protein LOC100125169
Str.18325.1.A1_at	LOC100127637	hypothetical protein LOC100127637
Str.15051.1.S1_at	LOC100135217	Hypothetical protein LOC100135217
Str.1340.2.S1_at	LOC100145083	hypothetical protein LOC100145083
Str.21798.1.S1_at	LOC100216164	hypothetical protein LOC100216164
Str.11945.1.S1_at	LOC496692	hypothetical LOC496692
Str.22124.1.S1_at	LOC496785	hypothetical LOC496785
Str.17221.1.S1_at	LOC549152	hypothetical protein LOC549152
Str.21546.1.S1_at	LOC549289	hypothetical protein LOC549289
Str.3137.1.S1_at	LOC549492	hypothetical protein LOC549492
Str.84.1.S1_at	mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
Str.6413.1.S1_a_at	MGC69505	MGC69505 protein
Str.287.1.S1_at	MGC75803	hypothetical protein MGC75803
Str.710.1.S1_at	MGC75949	hypothetical protein MGC75949
Str.830.1.S1_at	MGC75970	hypothetical protein MGC75970
Str.6893.1.S1_at	MGC76063	COP9 signalosome subunit 5
Str.20889.1.S1_s_at	MGC76063	COP9 signalosome subunit 5
Str.6796.1.S1_at	MGC76097	carnitine/acylcarnitine translocase
Str.24372.1.S1_s_at	MGC79787	MGC79787 protein
Str.52165.1.S1_s_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.1295.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.1362.1.S1_a_at	MGC97811	MGC97811 protein
Str.11979.1.S1_at	mrpl23	mitochondrial ribosomal protein L23
Str.10186.1.S1_at	ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa
Str.1896.1.S2_at	nola2	nucleolar protein family A, member 2

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.11112.1.S1_at	oprs1	oprs1 protein
Str.6228.1.S1_at	pcna	pcna protein
Str.7593.1.S1_at	psma7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 7
Str.13591.1.S1_at	psmb1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1
Str.1435.1.S1_at	psmd13	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13
Str.17153.1.A1_a_at	rbbp7	retinoblastoma binding protein 7
Str.51721.1.S1_at	rbpms2	RNA binding protein with multiple splicing 2
Str.6969.1.S1_at	rps6	ribosomal protein S6
Str.2049.3.S1_a_at	slc25a3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
Str.2049.2.S1_a_at	slc25a3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
Str.27202.1.S1_at	smarca5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
Str.9957.1.S1_at	spop	speckle-type POZ protein
Str.9533.2.S1_a_at	sppl3	signal peptide peptidase 3
Str.290.1.S1_s_at	TEgg033f08.1	MGC69396 protein
Str.10791.1.S1_at	TEgg046m03.1	F-box protein 5
Str.10339.1.S1_s_at	TGas057c05.1	replication protein A1, 70kDa
Str.1047.1.S1_at	TGas064h09.1	prohibitin 2
Str.1679.1.S1_a_at	TNeu089n18.1	ribosomal protein S23
Str.8172.1.S1_at	TNeu104f20.1 ///	UPF0585 protein C16orf13 homolog /// WAP, follistatin/kazal,
	wfikkn1	immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1
Str.7616.1.S1_at	trnt1	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1
Str.3011.1.S1_at	tsta3	tissue specific transplantation antigen P35B
Str.3286.1.S1_at	TTpA010e06.1	peroxiredoxin 2

Kategorie 2 (polyadenyliert während Reifung, unverändert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.9724.1.S1_at	aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
Str.5809.1.S1_at	capn1	calpain 1, (mu/l) large subunit
Str.14315.1.A1_a_at	LOC100144949	hypothetical protein LOC100144949
Str.5645.1.S1_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.50662.1.A1_s_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.50662.1.A1_x_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.27234.1.S2_a_at	MGC76214	hypothetical protein MGC76214
Str.286.1.S2_at	TGas142e24.1	high-mobility group 20A
Str.5927.1.S2_at	ube2h	ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog)
Str.9724.1.S1_at	aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
Str.5809.1.S1_at	capn1	calpain 1, (mu/l) large subunit
Str.14315.1.A1_a_at	LOC100144949	hypothetical protein LOC100144949
Str.5645.1.S1_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.50662.1.A1_s_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.50662.1.A1_x_at	MGC107795	MGC107795 protein
Str.27234.1.S2_a_at	MGC76214	hypothetical protein MGC76214
Str.286.1.S2_at	TGas142e24.1	high-mobility group 20A

Kategorie 3 (unverändert während Reifung, polyadenyliert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.10827.1.S2_at	capza2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
Str.10827.1.S1_at	capza2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
Str.5921.1.S1_at	e2f3	E2F transcription factor 3
Str.10770.1.S1_at	LOC779588	hypothetical protein LOC779588
Str.299.1.S1_at	tim13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)
Str.11786.1.A1_at	znf574	zinc finger protein 574
Str.27234.1.S2_a_at	MGC76214	hypothetical protein MGC76214

Kategorie 4 (polyadenyliert während Reifung, deadenyliert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.8413.1.S1_at	atic	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
Str.15861.1.S1_at	rabep1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1
Str.1679.1.S1_a_at	TNeu089n18.1	ribosomal protein S23

Kategorie 5 (unverändert während Reifung, deadenyliert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.27623.1.S1_at	adrm1	adhesion regulating molecule 1
Str.1620.1.S1_at	gamt	guanidinoacetate N-methyltransferase
Str.15297.1.S1_at	grhpr	grhpr protein
Str.37852.3.A1_a_at	LOC100145798	hypothetical protein LOC100145798
Str.5678.1.S1_a_at	LOC447981	hypothetical protein LOC447981
Str.1999.1.S1_at	LOC549006	hypothetical protein LOC549006
Str.20792.1.S1_at	LOC733864	hypothetical protein LOC733864
Str.6067.1.S1_at	MGC75699	ribosomal protein S3
Str.989.1.S1_at	MGC76130	hypothetical protein MGC76130
Str.1295.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.52165.1.S1_s_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.15833.1.S1_at	prdx3	prdx3 protein
Str.24756.1.S1_at	TGas028n11.1	formiminotransferase cyclodeaminase
Str.6150.1.A1_at	vdac2	voltage-dependent anion channel 2

Kategorie 6 (deadenyliert während Reifung, polyadenyliert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.11896.2.S1_at	---	---
Str.10460.1.S1_at	agpat4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)
Str.10583.2.S1_at	brca1	breast cancer 1, early onset
Str.1811.1.S1_at	cdk9	cyclin-dependent kinase 9
Str.6567.1.S1_at	cfl1	cofilin 1 (non-muscle)
Str.6885.1.S1_at	cox5a	cytochrome c oxidase, subunit Va
Str.22110.1.S1_at	LOC100170577	hypothetical protein LOC100170577
Str.24802.1.S1_at	LOC548854	hypothetical protein LOC548854
Str.15407.1.S1_at	lsm1	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
Str.16611.1.S1_at	MGC107838	MGC107838 protein
Str.6205.1.S1_at	MGC75715	hypothetical protein MGC75715
Str.6205.1.S2_at	MGC75715	hypothetical protein MGC75715
Str.4770.1.S1_at	MGC75981	Hypothetical protein MGC75981
Str.1276.1.S1_at	MGC76019	hypothetical protein MGC76019
Str.27671.1.S1_a_at	MGC76078	N-acetyltransferase 5
Str.10709.1.S1_at	MGC89693	MGC89693 protein
Str.24766.1.S1_at	pdlim1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)
Str.6229.1.A1_at	pou5f1.1	POU class 5 homeobox 1, gene 1
Str.6646.1.S1_at	rmf121	ring finger protein 121
Str.1730.1.S1_at	ruvbl2	RuvB-like 2
Str.1730.1.S1_a_at	ruvbl2	RuvB-like 2
Str.524.1.S2_at	snip1	Smad nuclear interacting protein 1
Str.492.1.S1_a_at	surfeit	surfeit gene 4
Str.6655.1.S1_at	TEgg054b02.1	mitochondrial outer membrane protein TOM40
Str.286.1.S2_at	TGas142e24.1	high-mobility group 20A
Str.17179.1.S1_at	tk1	thymidine kinase 1, soluble
Str.3387.1.S2_at	tmpo	thymopoietin
Str.17226.1.S1_at	xylt2	xylosyltransferase II

Kategorie 8 (deadenyliert während Reifung, deadenyliert nach Befruchtung)

Affymetrix Sondensatz ID	mRNA	Gen-Name
Str.51828.3.S1_s_at	---	---
Str.6054.1.S2_at	---	---
Str.5646.1.S1_at	arbp	acidic ribosomal phosphoprotein P0
Str.5646.1.S2_at	arbp	acidic ribosomal phosphoprotein P0
Str.9508.1.S1_at	capn8	calpain 8
Str.5255.1.A1_at	capn8	Calpain 8
Str.24243.1.S1_at	cks1b	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
Str.5337.1.S1_at	eno1	enolase 1, (alpha)
Str.9960.1.S1_at	fkbp6	FK506 binding protein 6
Str.1869.1.S1_at	gyg1	glycogenin 1
Str.1374.1.S1_s_at	LOC549795	hypothetical protein LOC549795
Str.1374.1.S1_x_at	LOC549795	hypothetical protein LOC549795
Str.1374.1.S2_at	LOC549795	hypothetical protein LOC549795
Str.29673.1.A1_at	LOC549795	Hypothetical protein LOC549795
Str.27670.1.S1_at	MGC75766	ATP synthase subunit B
Str.1295.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.10584.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.52165.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.52165.1.S1_s_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.1295.1.S1_at	MGC89973	MGC89973 protein
Str.9100.1.S1_a_at	TGas044l18.1	60S ribosomal protein L35
Str.9100.3.S1_a_at	TGas044l18.1	60S ribosomal protein L35
Str.1679.1.S1_a_at	TNeu089n18.1	ribosomal protein S23
Str.6703.1.S1_at	TNeu119p20.1	ribosomal protein SA

8 Danksagung

Mein Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke und Herrn Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die ausführlichen wissenschaftlichen Diskussionen sowie die Möglichkeit an zwei Instituten zu arbeiten und sich ein neues Themenfeld zu erschließen. Ich danke für ihr Vertrauen und die Freiheit eigenen Ideen nachzugehen sowie für die Möglichkeit an zahlreichen wissenschaftlichen bzw. weiterbildenden Veranstaltungen, Meetings und Workshops teilzunehmen, Neues zu entdecken und meine Arbeit zu präsentieren.

Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpass sowie dem Biochip-Labor für die Unterstützung und intensive Zusammenarbeit bei der Microarray Analyse. Danke für die wertvollen Anregungen und Ratschläge zur Methodik und zum Projektverlauf und vor allem für die sehr fruchtbare, konstruktive Kritik. Sie hat maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen.

Frau Katrin Rademacher für ihre große Hilfsbereitschaft, die sehr gute Zusammenarbeit bei der Motivsuche und für die Beantwortung bioinformatischer Fragen.

Herrn Dr. Yann Audic für die Bereitstellung der Originaldaten der Microarray Experimente aus Graindorge et al., 2006.

Frau Sabine Senkel für ihr unschätzbares Engagement und technisches Wissen, für die vielen Ratschläge, Fragen und Antworten und ihre Kollegialität.

Allen ehemaligen Kollegen des Instituts für Zellbiologie, speziell der AG Entwicklungsbiologie, des Instituts für Humangenetik sowie Mitwirkenden des Graduiertenkollegs für anregende Fragen, Interesse an meinem Projekt sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre bedingungslose Unterstützung.

Meinem Mann für seine außergewöhnliche Geduld und den Mut neue Wege zu bestreiten
und meinem Sohn für die Faszination Leben.

9 Publikationen, Vorträge, Poster

Publikation:

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Rademacher,K., Horsthemke,B., Ryffel,G.U. (2010) Aging of *Xenopus tropicalis* eggs leads to deadenylation of a specific set of maternal mRNAs and loss of developmental potential. PLoS One 5(10): e13532.

Vorträge:

Kosubek,A., Postovulatory aging of *Xenopus* eggs, Annual retreat DFG Training Program, 16 - 17. April 2010 in Düsseldorf

Kosubek,A., Maternal mRNA alterations upon egg aging, Chromatin 2010 - Konferenz Transcription, Chromatin & DNA repair in development and differentiation, 7 - 10. Juli 2010 in Essen

Kosubek,A., Maternal mRNA alterations upon egg aging, Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE) School 12 - 13. Sept. 2010 in Günzburg

Kosubek,A., Maternal mRNA alterations upon egg aging, 9.Forschungstag der Medizinischen Fakultät, 12. Nov. 2010 in Essen

Postervorträge:

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., The declining potential of the aged *Xenopus* egg, Annual retreat DFG Training Program, 11 - 13. Sept. 2008 in Dormagen-Zons

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., The declining potential of the aged *Xenopus* egg, Annual retreat DFG Training Program, 3 – 5. Sept. 2009 in Dormagen-Zons

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., The declining potential of the aged *Xenopus* egg, 6th ESHRE Workshop on Mammalian Folliculogenesis and Oogenesis, 8 - 10. Okt. 2009 in Potsdam

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., Molecular events involved in the declining potential of the aged *Xenopus* egg, German-Italian *Xenopus* Meeting; 26 - 29. Okt. 2009 in Menaggio, Italien

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Rademacher,K., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., Egg Aging Leads to Deadenylation of a Specific Set of mRNAs and Loss of Developmental Potential, Germ Cell Meeting 5 – 9. Okt. 2010 in Cold Spring Harbor, NY, USA

Kosubek,A., Klein-Hitpass,L., Rademacher,K., Horsthemke,B., Ryffel,G.U., Egg Aging Leads to Deadenylation of a Specific Set of mRNAs and Loss of Developmental Potential, 9. Forschungstag der Medizinischen Fakultät 12. Nov. 2010 in Essen

10 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wurde der Lebenslauf in der elektronischen Version der Dissertation entfernt.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Postovulatorische Alterung in *Xenopus tropicalis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anna Kosubek befürworte.

Essen, den 13.02.2013

Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 13.02.2013

Anna Kosubek

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 13.02.2013

Anna Kosubek